

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**  
**ANKARA ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SELÜLİN KOZMETİK BAKIMINDA**  
**LİPİD NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERİN**  
**GELİŞTİRİLMESİNE YÖNELİK ÇALIŞMALAR**

**Çağla ÖZTÜRK**

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**  
**KOZMETOLOJİ YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. M. Nilüfer TARIMCI**

**ANKARA**  
**2019**

## ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Selülinin Kozmetik Bakımında Lipid Nanopartiküler Sistemlerin Geliştirilmesine Yönelik Çalışmalar” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

## İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	ii
KABUL ve ONAY	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÖNSÖZ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xii
ÇİZELGELER	xiii
<b>1.GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1.Derinin Yapısı ve Özellikleri	1
1.1.1.Epidermis	2
1.1.2.Dermis	3
1.1.3.Hipodermis	4
1.2.Deriden Emilim ve Geçiş Yolları	4
1.2.1.Deriden Geçiş Etkileyen Faktörler	6
1.3.Kozmetik Ürünlere Genel Bakış	7
1.3.1.Kozmesötikler/Dermakozmetikler	8
1.3.2.Kozmesötik/Dermakozmetik Etkin Maddelerin Sınıflandırması	9
1.4.Kozmetik Taşıyıcı Sistemler	11
1.4.1.Modern Kozmetik Taşıyıcı Sistemler	12
1.4.2.Modern Kozmetik Taşıyıcı Sistemlerin Sınıflandırılması	13
1.4.3.Kozmetik Taşıyıcı Sistem Olarak Lipid Nanopartiküller	17
1.4.4.Lipid Nanopartiküllerin Avantaj ve Dezavantajları	18
1.4.5.Lipid Nanopartiküllerin Hazırlama Yöntemleri	20
1.4.6.Lipid Nanopartiküllerin Karakterizasyonları	21
1.4.7.Lipid Nanopartikülle Hazırlanan Piyasa Preparatları	23
1.5.Tasarımla Kalite Yaklaşımı	24
1.5.1.Yapay Zeka Araçları	28
1.6.Selülit	29
1.6.1.Selülit Oluşumu ve Evreleri	30

1.6.2.Selülit Belirtilerini Azaltıcı veya Giderici Uygulamalar	32
1.6.3.Topikal Tedavi Hedefleri	33
1.6.4.Topikal Tedavide Kullanılan Ajanlar	34
1.7.Kafein	34
1.7.1.Fizikokimyasal Özellikleri	35
1.7.2.Farmakolojik Özellikleri	36
1.7.3.Kafeinin Topikal Kullanımı	36
1.7.4.Kafeinin Selülitte Kullanımı	37
<b>2.GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>39</b>
2.1.Kullanılan Cihaz ve Kimyasal Malzemeler	39
2.1.1.Kullanılan Cihazlar	39
2.1.2.Kimyasal Malzemeler	40
2.2.Kafein ile Yapılan Çalışmalar	41
2.2.1.Kafeinin Ultraviyole (UV) Spektrumunun Belirlenmesi	41
2.2.2.Kafeinin Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC) Analizi	41
2.2.3.Kafeinin Kalibrasyon Doğrularının Belirlenmesi	42
2.2.3.1.Kafeinin Metanol İçindeki Kalibrasyon Doğrusunun Belirlenmesi	42
2.2.3.2.Kafeinin pH 7,4 PBS Çözeltisi İçindeki Kalibrasyon Doğrusunun Belirlenmesi	42
2.2.4.Kafeinin Miktar Tayini Yönteminin Analitik Validasyonu	42
2.2.4.1.Doğrusallık ve Aralığı	43
2.2.4.2.Doğruluk ve Geri Elde	43
2.2.4.3.Kesinlik	44
2.2.4.3.1.Tekrarlanabilirlik (Tekrar Edilebilirlik)	44
2.2.4.3.2.Ara Kesinlik	44
2.2.4.4.Teşhis ve Tayin Sınırları (LOD, LOQ)	45
2.2.4.5.Özgünlük	45
2.2.4.6.Kafeinin Kısa Süreli Stabilite Tayini	46
2.3.Farmasötik Gelişim ve Tasarımla Kalite Çalışmaları	46
2.3.1.Ön Formülasyon Çalışmaları	49

2.3.1.1.Yüksek Basınçlı Homojenizasyon Yöntemiyle Yarı Katı Lipid Nanopartiküllerin Hazırlanması için Gerçekleştirilen Ön Çalışmalar	50
2.3.1.2. Yüksek Hızda Karıştırma ve Ultrasonikasyon Yöntemiyle Yarı Katı Lipid Nanopartiküllerin Hazırlanması için Gerçekleştirilen Ön Çalışmalar	52
2.3.1.3.Bilgi Alanı İçerisinde Yarı Katı NLC Formülasyonlarının Hazırlanması	53
2.3.2.Kontrol Stratejisi Kapsamında Yarı Katı NLC Formülasyonu Üzerinde Yapılan Çalışmalar	55
2.3.2.1.Yarı Katı NLC Formülasyonlarında Partikül Büyüklüğü, Polidispersite İndeksi ve Zeta Potansiyel Tayini	55
2.3.2.2.Yarı Katı NLC Formülasyonlarının İşlem Etkinliği (%EE) Tayini	55
2.3.2.3.Yarı Katı NLC Formülasyonlarının Mekanik Özelliklerin Tayini	56
2.3.2.4.Yarı Katı NLC Formülasyonlara Ait İn Vitro Oklüzyon Faktörünün Belirlenmesi	57
2.4.Elde Edilen Verilerin Yapay Sinir Ağları ile Değerlendirilmesi ve Formülasyon Optimizasyonu	58
2.5.Optimum Formülasyon Üzerinde Yapılan Çalışmalar	61
2.5.1.Optimum Formülasyon Kritik Kalite Özelliklerine Ait Çalışmalar	61
2.5.2.Optimum Formülasyon Üzerinde Yapılan İn Vitro Etkin Madde Salım Tayini	62
2.5.2.1.Franz Difüzyon Hücresi Çalışması	62
2.5.2.2.Statik Yöntem	63
2.5.3.Optimum Formülasyon Üzerinde Yapılan Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC) Analizi	63
2.5.4.Optimum Formülasyonda Yapılan Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM) Analizi	64
2.5.5.Optimum Formülasyonda Yapılan pH ve Viskozluk Ölçümleri	64
2.5.6.Stabilite Çalışmaları	65
<b>3.BULGULAR</b>	66
3.1.Kafein ile Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular	66
3.1.1.Kafeinin UV Spekturumu	66
3.1.2.Kafeinin Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC) Analizi	66

3.1.3.Kafeinin Kalibrasyon Doğrularının Belirlenmesine Ait Bulgular	67
3.1.3.1.Kafeinin Metanol İçindeki Kalibrasyon Doğrusuna Ait Bulgular	67
3.1.3.2.Kafeinin pH 7,4 PBS Tamponu İçindeki Kalibrasyon Doğrusuna Ait Bulgular	68
3.1.4.Kafeinin Miktar Tayini Yönteminin Analitik Validasyonuna Ait Bulgular	68
3.1.4.1.Doğrusallık ve Aralığı	68
3.1.4.2.Doğruluk ve Geri Elde	69
3.1.4.3.Kesinlik	71
3.1.4.3.1.Tekrar Edilebilirlik	71
3.1.4.3.2.Ara Kesinlik	71
3.1.4.4.Teşhis ve Tayin Sınırları	73
3.1.4.5.Özgünlük	73
3.1.4.6.Kafeinin Kısa Süreli Stabilite Tayini Sonuçları	74
3.2.Farmasötik Gelişim ve Tasarımla Kalite Çalışmalarına Ait Bulgular	74
3.2.1.Ön Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	74
3.2.1.1.Yüksek Basıncılı Homojenizasyon Yöntemiyle Yarı Katı Lipid Nanopartiküllerin Hazırlanmasına Ait Bulgular	74
3.2.1.2.Yüksek Hızda Karıştırma ve Ultrasonikasyon Yöntemiyle Yarı Katı Lipid Nanopartiküllerin Hazırlanmasına Ait Bulgular	75
3.2.2.Bilgi Alanı İçerisinde Yarı Katı NLC Formülasyonlarının Hazırlanmasına Ait Bulgular	76
3.2.3.Kontrol Stratejisi Kapsamında Yarı Katı NLC Formülasyonu Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular	77
3.2.3.1.Yarı Katı NLC Formülasyonlarında Partikül Büyüklüğü, Polidispersite İndeksi ve Zeta Potansiyel Tayinine Ait Bulgular	77
3.2.3.2.Yarı Katı NLC Formülasyonlarının İşlem Etkinliği (%EE) Tayinine Ait Bulgular	78
3.2.3.3.Yarı Katı NLC Formülasyonlarının Mekanik Özelliklerin Tayinine Ait Bulgular	78
3.2.3.1.Yarı Katı NLC Formülasyonlarına Ait İn Vitro Oklüzyon Faktörünün Belirlenmesine Ait Bulgular	79

3.3.Elde Edilen Verilerin Yapay Sinir Ağları ile Değerlendirilmesi ve Formülasyon Optimizasyonuna Ait Bulgular	82
3.4.Optimum Formülasyon Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular	83
3.4.1.Optimum Formülasyonun Kritik Kalite Özelliklerine Ait Bulgular	83
3.4.2.Optimum Formülasyon Üzerinde Yapılan İn-Vitro Etkin Madde Salım Tayinine Ait Bulgular	84
3.4.2.1.Franz Difüzyon Hücresi Yöntemi ile Yapılan Çalışmaya Ait Bulgular	84
3.4.2.2.Statik Yöntem ile Yapılan Çalışmaya Ait Bulgular	85
3.4.3.Optimum Formülasyon Üzerinde Yapılan Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC) Analizine Ait Bulgular	85
3.4.4.Optimum Formülasyon Üzerinde Yapılan Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizine Ait Bulgular	86
3.4.5.Optimum Formülasyonda Yapılan pH ve Viskozluk Ölçümlerine Ait Bulgular	87
3.5.Stabilite Çalışmasına Ait Bulgular	87
<b>4. TARTIŞMA</b>	88
4.1.Kafein ile Yapılan Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi	88
4.2.Farmasötik Gelişim ve Tasarımla Kalite Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	89
4.3.Elde Edilen Verilerin Yapay Sinir Ağları ile Değerlendirilmesi ve Formülasyon Optimizasyonu ile İlgili Bulguların Değerlendirilmesi	99
4.4.Optimum Formülasyon Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi	102
<b>5.SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	108
<b>ÖZET</b>	110
<b>SUMMARY</b>	111
<b>KAYNAKLAR</b>	112
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	121

## ÖNSÖZ

Bu çalışmada selülitin kozmetik bakımında kullanılmak üzere, ksantin türevi bir alkoloid olan kafein yüklü yarı katı nano yapılı lipid taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla iki farklı üretim yöntemi kullanılarak hazırlanan lipid nanopartikül sistemler için tasarımıyla kalite çalışmaları yapılmış, formülasyon optimizasyonu için ise yapay sinir ağları programı kullanılmıştır. Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Ana Bilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmam sırasında her türlü bilimsel desteği sağlayan, engin bilgi ve tecrübesiyle bana her konuda destek olan, karşılaştığım her zorlukta ilgisi ve desteği ile yol gösteren, yardımını esirgemeyen çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Nilüfer TARIMCI'ya,

Eğitim hayatım boyunca gösterdikleri ilgi, destek ve bilimsel katkılarından dolayı başta Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Sayın Nurten ÖZDEMİR olmak üzere Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi saygıdeğer hocalarıma ve araştırma görevlisi değerli arkadaşlarıma,

Öneri ve düşünceleriyle bana yol gösteren, destekleyici yaklaşımıyla her zaman yanımda olan, güler yüzü ile beni rahatlatan, yoğun çalışma temposunda dahi ilgisini hiç eksik etmeyen sevgili hocam Dr. Gülin AMASYA'ya,

Tasarımıyla kalite çalışmalarım boyunca bana sınırsız destek sağlayan Doç.Dr.Buket AKSU'ya;

DSC ve TPA çalışmalarımda yardımlarından dolayı Dr.Öğr.Üyesi Özge İNAL'a;



Her ne olursa olsun sonsuz güven ve sevgi ile daima yanımda olan, verdiğim her kararda bana destek olan, hayatımın her aşamasında gösterdikleri sabır ve özveri için annem Şaziye ŞEREN ve babam Alper Şeren'e, hep yanımda ve her zaman benimle olan, ilgisi ve desteği ile beni hiç yalnız bırakmayan, zor zamanlarımda moral veren eşim Barış ÖZTÜRK'e ve daha anne karnındayken akademik hayatın zorluklarını deneyimlemeye başlayıp tezim süresince bana eşlik eden canım kızım Duru ÖZTÜRK'e,

Tez çalışmamda emeği geçen, beni cesaretlendiren ve manevi destek sağlayan değerli dostlarıma, varlıklarını yanımda hissettiğim herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



## SİMGELER VE KISALTMALAR

%BS	Yüzde Bağlı Sapma
CMA	Kritik Materyal Özellikleri (Critical Material Attributes)
CPPs	Kritik proses parametreleri (Critical Process Parameters)
CQAs	Kritik kalite özellikleri (Critical Quality Attributes)
DoE	Deney Tasarımı (Design of Experiments)
DSC	Differential scanning calorimetry / Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
FDA	United States Food and Drug Administration / Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GMP	Good Manufacturing Process / İyi İmalat Uygulamaları
ICH	Uluslararası Uyum Konferansı - The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
NLC	Nano Yapılı Lipid Taşıyıcılar
PAT	Proses Analitik Teknolojileri - Process Analytical Technology
QbD	Tasarımla Kalite (Quality by Design)
QbT	Test ile Kalite (Quality by Test)
QTPP	Hedef Ürün Kalite Profili (Quality Target Product Profile)
SLN	Katı Lipid Nanopartiküller
SS	Standart Sapma
TEM	Transmission Electron Microscopy / Geçirimli Elektron Mikroskopisi
TPA	Texture Profile Analysis – Tekstür Profil Analizleri
UV	Ultraviolet / Ultraviyole

## ŞEKİLLER

<b>Şekil 1.1.</b>	Derinin yapısı ve tabakaları	1
<b>Şekil 1.2.</b>	Deriden emilim ve geçiş yolları	5
<b>Şekil 1.3.</b>	Modern Taşıyıcı Sistemlerin Sınıflandırılması	13
<b>Şekil 1.4.</b>	Lipozom yapısı ve tabakaları	15
<b>Şekil 1.5.</b>	Nanoemulsiyon ve lipozomların yapısal farklılıkları	16
<b>Şekil 1.6.</b>	SLN ve NLC arasındaki yapısal farklılıklar	18
<b>Şekil 1.7.</b>	Kafein açık formülü	35
<b>Şekil 2.1.</b>	TA-XT Plus Tekstür analiz aleti ve şematik görünümü	56
<b>Şekil 3.1.</b>	Kafeinin UV spektrumu	66
<b>Şekil 3.2.</b>	Kafeinin Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC) Termogramı	67
<b>Şekil 3.3.</b>	Kafeinin Metanol Ortamında UV 273 nm'deki Kalibrasyon Doğrusu.	67
<b>Şekil 3.4.</b>	Kafeinin pH 7,4 PBS Ortamında UV 273 nm'deki Kalibrasyon Doğrusu	68
<b>Şekil 3.5.</b>	Kafeinin metanoldaki (A) ve pH 7,4 PBS tamponundaki (B) miktar tayini yönteminin doğrusalık ve aralığı çalışmasına ait doğrular	69
<b>Şekil 3.6.</b>	Compritol 888 ATO içeren formülasyonlara ait 6, 12, 24. saat oklüzif özellikleri.	80
<b>Şekil 3.7.</b>	Precirol ATO 5 içeren formülasyonlara ait 6, 12, 24. saat oklüzif özellikleri.	80
<b>Şekil 3.8.</b>	Tripalmitin içeren formüllere ait 6, 12, 24. saat oklüzif özellikleri.	81
<b>Şekil 3.9.</b>	Tristearin içeren formüllere ait 6, 12, 24. saat oklüzif özellikleri.	81
<b>Şekil 3.10.</b>	Optimum formülasyona ait Franz Difüzyon Hücresi Yöntemi ile elde edilen salım profili.	84
<b>Şekil 3.11.</b>	Optimum formülasyona Statik Yöntem ile elde edilen salım profili.	85
<b>Şekil 3.12.</b>	Tristearin (A), Precirol ATO 5 (B), Kafein eklenmemiş boş NLC (C), Optimum formülasyon (D), Kafein (E).	86
<b>Şekil 3.13.</b>	Optimum yarı katı NLC formülasyonuna ait TEM mikrografı.	86
<b>Şekil 4.1.</b>	INform V5.01 ANN programından elde edilen bazı üç boyutlu grafik örnekleri	101

## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 1.1.</b>	Derinin doğal antioksidan savunma mekanizmasında yer alan maddelerden bazıları.	10
<b>Çizelge 1.2.</b>	Farmasötik gelişimde tasarımla kaliteye karşı test ile kalite	25
<b>Çizelge 2.1.</b>	Yarı katı lipid nanopartiküllere ait hedef ürün kalite profili	48
<b>Çizelge 2.2.</b>	Kalite Özellikleri ve Kafein İçeren Yarıkatı Lipid Nanopartiküllerin Kritik Kalite Özellikleri	48
<b>Çizelge 2.3.</b>	Yüksek Basıncılı Homojenizasyon Yöntemiyle Hazırlanan Lipid Nanopartikül Formülasyonları	51
<b>Çizelge 2.4.</b>	Yüksek Hızda Karıştırma ve Sonikasyon Yöntemiyle Hazırlanan Lipid Nanopartiküller	52
<b>Çizelge 2.5.</b>	Kritik proses parametreleri ve kritik materyal özellikleri	53
<b>Çizelge 2.6.</b>	QbD çalışması kapsamında hazırlanan yarı katı NLC formülasyonları.	54
<b>Çizelge 2.7.</b>	TPA Test Parametreleri	56
<b>Çizelge 2.8.</b>	Yapay sinir ağı programında kullanılan girdi ve çıktılar	58
<b>Çizelge 2.9.</b>	Model oluşturmak amacıyla yapay sinir ağı programına aktarılan girdi ve çıktılar	59
<b>Çizelge 2.10.</b>	YSA Programından elde edilen optimum formülasyon bileşenleri.	61
<b>Çizelge 3.1.</b>	Kafeinin metanoldeki ve pH 7,4 PBS tamponundaki miktar tayini yönteminin doğruluk ve aralığı çalışmasına ait veriler.	69
<b>Çizelge 3.2.</b>	Kafeinin metanoldeki UV spektrum yöntemi ile belirlenen geri elde edilebilirlik testine ait veriler	70
<b>Çizelge 3.3.</b>	Kafeinin pH 7.4 PBS tamponundaki UV spektrum yöntemi ile belirlenen geri elde edilebilirlik testine ait veriler	70
<b>Çizelge 3.4.</b>	Kafeinin metanol ve pH 7,4 PBS miktar tayini yönteminin tekrar edilebilirlik çalışması sonuçları.	71
<b>Çizelge 3.5.</b>	Kafeinin metanoldeki miktar tayini yönteminin ara kesinlik çalışması sonuçları	72
<b>Çizelge 3.6.</b>	Kafeinin pH 7.4 PBS tamponundaki miktar tayini yönteminin ara kesinlik çalışması sonuçları.	72
<b>Çizelge 3.7.</b>	Kafeinin metanol ve pH 7,4 PBS ortamındaki miktar tayini yönteminin teşhis ve tayin sınırları.	73
<b>Çizelge 3.8.</b>	Kafeinin kısa süreli stabilitesi	74
<b>Çizelge 3.9.</b>	Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemiyle hazırlanan 1. grup lipid nanopartiküllere ait bulgular.	75
<b>Çizelge 3.10.</b>	Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemiyle hazırlanan 2. grup lipid nanopartiküllere ait bulgular.	75
<b>Çizelge 3.11.</b>	Yüksek hızda karıştırma ve sonikasyon yöntemiyle hazırlanan lipid nanopartiküllere ait bulgular.	76
<b>Çizelge 3.12.</b>	NLC formülasyonlarına ait partikül büyüklükleri, PDI ve zeta potansiyeli değerleri.	77
<b>Çizelge 3.13.</b>	NLC formülasyonlarına ait %EE değerleri.	78

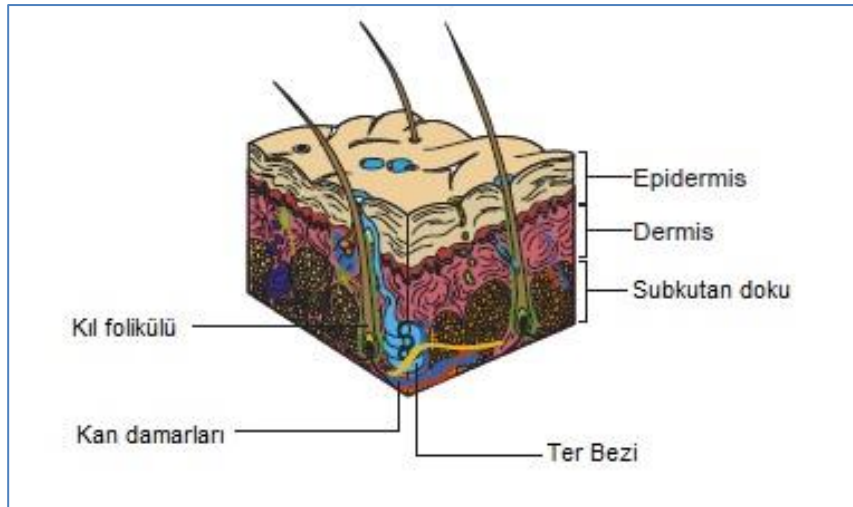
<b>Çizelge 3.14.</b>	NLC formülasyonlarının mekanik özelliklerine ait bulgular	79
<b>Çizelge 3.15.</b>	Model girdi/çıkıı verilerinin YSA Programında değerlendirilmesi sonucu elde edilen modele ait $r^2$ değerleri	82
<b>Çizelge 3.16.</b>	YSA Programından Elde Edilen Optimum formülasyon bileşenleri.	82
<b>Çizelge 3.17.</b>	Optimum formülasyona ait kritik kalite özellikleri ve programın önerdiği analiz verileri.	84
<b>Çizelge 3.18.</b>	Optimum Formülasyonda mekanik özelliklere ait veriler.	84
<b>Çizelge 3.19.</b>	Optimum formülasyona ait pH ve vizkozluk ölçümü sonuçları	87
<b>Çizelge 3.20.</b>	Optimum formülasyon stabilite çalışması başlangıç ve 1.ay bulguları	87
<b>Çizelge 4.1.</b>	Yarı katı lipid nanopartiküllere ait hedef ürün kalite profili	91
<b>Çizelge 4.2.</b>	Kalite özellikleri ve kafein içeren yarı katı lipid nanopartiküllerin kritik kalite özellikleri	91
<b>Çizelge 4.3.</b>	YSA programından elde edilen optimum formülasyon bileşenleri.	100
<b>Çizelge 4.4.</b>	Optimum formülasyona ait YSA programından gelen tahminler ve analiz sonucu elde edilen veriler.	102
<b>Çizelge 4.5.</b>	Optimum formülasyon ve piyasa preparatlarının mekanik özelliklere ait veriler	104

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Derinin Yapısı ve Özellikleri

Deri insan vücudunun en üst katmanı ve gerek yüzey alanı gerekse ağırlık bakımından vücudumuzun en büyük organıdır. Altında barındırdığı kas ve organları koruyan derimiz, sıcaklık, nem ya da basınç gibi dış faktörlere karşı da koruma sağlar, patojenlerin vücuda girişini engeller ve vücut sıcaklığını düzenler (Montagna ve Parakkal, 1974). Derinin diğer görevleri arasında bağışıklık sistemine destek vermesi, vücut sıcaklığının düzenlenmesi, biyokimyasal ve metabolizma gibi işlevleri gerçekleştirmesi sayılabilir.

Vücudumuzu saran derinin içerisinde sinirler, savunma sistemi bileşenleri, kan damarları, ter ve yağ bezleri, kıl folikülleri bulunmaktadır. Embriyolojik dönemde ektoderm ve mezodermden köken alan insan derisi epidermis, dermis ve hipodermis (subkütan doku) gibi tabakalardan meydana gelmiştir (Katz ve Poulsen, 1971). Derinin yapısı ve tabakaları Şekil 1.1’de şematik olarak gösterilmiştir. Ayrıca deri yapısında farklı kökenlerden gelen Langerhans hücreleri, melanositler ve tırnaklar gibi yapılar da mevcuttur (Değim, 2007).



Şekil 1.1. Derinin yapısı ve tabakaları.

### 1.1.1. Epidermis

Epidermis vücudun dış yüzeyini kaplayan çok katlı epitel dokusudur. Temelde keratinositlerden ve dendritik hücrelerden meydana gelir. Fiziksel ve kimyasal olarak vücudu dış etkilere koruyan epidermin kalınlığı farklı vücut bölgelerinde (göz çevresi 0,05 mm ayak tabanı 1,5 mm) değişim gösterir. Epidermis tabakaları içeriden dışarıya doğru; “*stratum basale*” (*stratum germinativum*), “*stratum spinosum*”, “*stratum granulosum*”, “*stratum lucidum*” ve “*stratum corneum*” olarak sıralanırlar (Değim, 2007).

Bazal tabaka ya da *stratum germinativum*, silindirik şeklindeki hücrelerden meydana gelen epidermin en alt katmanıdır. Bazal tabaka derinin yenilenmesinden sorumludur. Bu tabakadaki hücreler sürekli bölünerek ve dışarıya doğru farklılaşarak (keratinize olarak) epidermis tabakaları arasında hareket eder. Bazal hücrelerin en dış tabakaya kadar ulaşması yaklaşık bir ay sürmektedir (Değim, 2007). Epidermis ve dermis arasında bulunan bazal tabaka, dermis tabakasına bazal membran ile bağlanır. Deriye rengini veren melanin üretimi bu tabakada bulunan melanositler tarafından gerçekleşmektedir. Ayrıca, antijenlerin tanınmasından sorumlu olan Langerhans hücreleri ve basıncın tanınmasından sorumlu olan Merkel hücreleri de bazal tabakada bulunmaktadır (Menon, 2002; Venus ve ark., 2011).

Bazal tabakanın hemen üstünde sitoplazmaları keratin filamentleri bakımından zengin hücrelerden oluşan *stratum spinosum* tabakası bulunur. Bu tabaka olgunlaşarak yukarı itilen bazal hücrelerden meydana gelmiştir. Hücreler desmozom adı verilen özel bir zar yapısı ile birbirlerine tutunurlar. Bu tabakadaki hücreler immünolojik reaksiyonların oluşumunda önemli rol oynar (Menon, 2002; Venus ve ark., 2011).

Epidermin canlı hücre içeren en dıştaki tabakası *stratum granulosum* tabakasıdır. Ortalama olarak üç mikron kalınlığında olan bu tabakada keratinizasyon süreci başlar. Keratinizasyon sürecinde organelleri çözülmeye başlayan hücreler, keratin fiberleri ile dolmaya başlarken aynı zamanda morfolojik olarak düzleşmeye de

başlar. Lipid ve protein miktarı bakımından zengin olan bu tabaka derinin beyazlığını ve matlığını da düzenler.

*Stratum lucidum*, genellikle derinin kalınlaştığı yerlerde (ayak tabanı ya da avuç içi gibi) bulunan, hücreleri belli belirsiz, çekirdek ve organel bulundurmayan ölü hücrelerden oluşan soluk pembe renkteki tabakadır. Bu tabaka keratin sentezi için gereksinim duyulan kükürt içeren aminoasitler bakımından zengindir.

Bazal tabakadan başlayarak yüzeye doğru ilerleyen hücrelerin keratinizasyonu sonucunda epidermisin en dış tabakası olan *stratum corneum* meydana gelir. Epidermisin bu bölgesinde metabolik olarak aktif olmayan, çekirdeklerini tamamen kaybetmiş, ölü, heksagonal yapıda, korneosit adı verilen boynuzsu hücreler bulunmaktadır. Proteinik yapılı bir zarf ile çevrili olan korneositler ağırlığının üç katı kadar su tutabilme kapasitesine sahiptirler ve içlerinde su tutabilen keratin proteinleri mevcuttur. Seramidler, yağ asitleri, kolesterol ve kolesterol sülfattan oluşan lipid çifte tabaka korneositleri birbirine bağlar. Bu yapı literatürde “tuğla ve harç modeli” olarak geçmektedir. Bu tabaka derinin su kaybetmesini ve vücuda dışarıdan madde girişini engelleyen önemli bir tabakadır (Değim, 2007).

### **1.1.2. Dermis**

Dermis, epidermis ve subkütan yağ doku arasında yer alan kollajen ve elastin liflerin bulunduğu tabakadır. Kalınlığı göz çevresinden başlayarak el ve ayak tabanlarına doğru gittikçe artan dermis tabakası kollajen, elastin ve proteoglikanların sentezini gerçekleştiren fibroblast hücrelerini içerir. Ayrıca, bağışıklık yanıtı oluşturan mast hücreleri ve melanin sentezleyen melanositler de bu tabakada yer alır. Yapısındaki fibröz matrikste, sinirler, kan damarları ve lenf kanalları yer almaktadır.

Dermis papiller ve retiküler tabaka olmak üzere iki tabaka halinde bulunmaktadır. Papiller tabaka, ince kollajen fibriller ve geniş fibriller arası



boşluklardan meydana gelir. Retiküler tabaka ise kalın kollajen demetlerden ve daha az fibriller arası boşluklardan meydana gelir (Yüksel ve Tarımcı, 1988).

Dermis vücudun sıcaklığının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Bu fonksiyonu içeriğinde bulunan ekrin ter bezleri sayesinde gerçekleştirir. Yaygın sinir ağına sahip olmasından dolayı nöroreseptör gibi davranan dermis, ağrı, kaşıntı ve sıcaklık gibi duyuvarın algılanmasını sağlar. İçerdiği apokrin bezlerden salgılanan maddeler bakteriler tarafından modifiye edildiğinde vücudun kendine özgü kokusu ortaya çıkar. Diğer görevleri arasında vücudun en iç kısmındaki bileşenleri mekanik yaralanmalardan korumak, içerisinde bulunan damar ağı sayesinde epidermisin besin ihtiyacını karşılamak, deriye esneklik ve dayanıklılık vermek sayılabilir.

### **1.1.3. Hipodermis**

Hipodermis ya da sübkutan doku, dermis tabakasının hemen altında yer alır. Bu tabaka büyük miktarda yağ üreten ve depolayan hücrelerden oluşmaktadır. Hipodermis tabakası, altındaki yapıları fiziksel etkilerden (mekanik ve ısı değişimlerinden) korur, derinin hareketli olmasını sağlar, enerji sağlar ve bazı hormonlar için depo görevi görür (Menon, 2002; Venus ve ark., 2011).

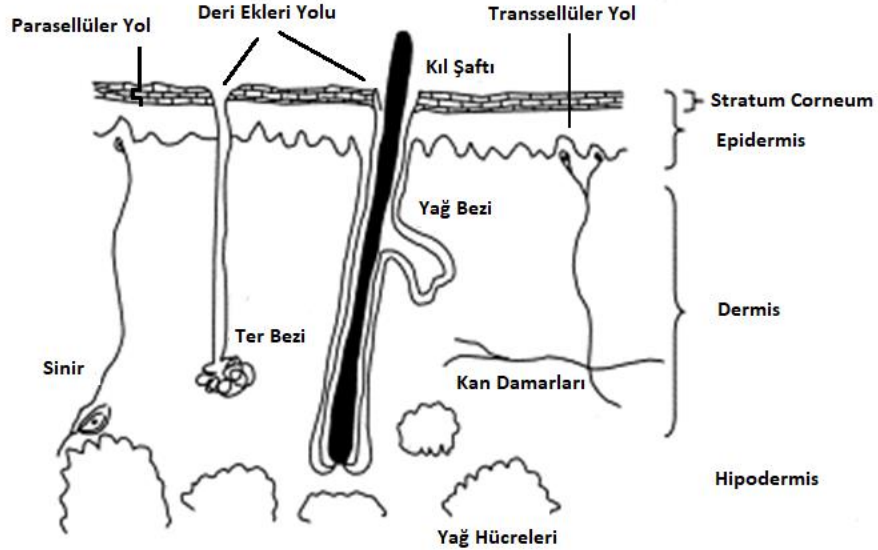
## **1.2. Deriden Emilim ve Geçiş Yolları**

Deriden emilim, deri yüzeyine uygulanan topikal bir dozaj formundan etkin maddenin/aktif bileşenin salınarak, epidermisten penetre olması ve dermis tabakasından mikrosirkülasyona girmesi olayıdır. Deriden emilim olayına, perkütan absorpsiyon adı da verilmektedir.

İlaçların deriden emiliminde *stratum corneum* tabakası, derinin hem en dış katmanı olması hem de kompleks yapısı nedeniyle kritik öneme sahiptir. Lipofilik

moleküllerin *stratum corneum* tabakasından geçişi pasif difüzyon mekanizması ile gerçekleşmektedir. Genel olarak maddelerin deriden geçerken hücreler arası (interselüler) geçiş, hücreler içinden (intraselüler) geçiş ve porlardan/boşluklardan geçiş yollarını kullandığı saptanmıştır (Barry, 2001; Değim, 2007). Deriden emilim ve geçiş yolları Şekil 1.2’de şematik olarak gösterilmiştir.

Etkin maddenin fizikofarmasötik özellikleri, lipofilik ya da hidrofilik afinitesi, elektriksel yükü, molekül büyüklüğü deriden emilimde önemli rol oynar. Hücreler arası geçiş mekanizmasında, madde membrandaki protein ve lipidlerle etkileşir. Hücreler arasındaki boşluğun su ve protein içeriği deriye uygulanan lipofilik materyaller için fiziksel bariyer oluşturmaktadır. İntraselüler geçiş yolunu kullanan maddeler hücrelerin içerisinden geçerek deri katmanları arasında ilerlerler. Genel yapısal özelliği lipofilik olan hücre membranı, partiyon katsayısı düşük olan hidrofilik maddelere karşı bariyer olarak görev yapar. Porlardan/boşluklardan geçiş yolunu kullanan maddeler düşük dirençli kısa bir yol kat ederek dolaşıma girerler. Bu yol suda çözünürlüğü yüksek olan maddeler için önemli bir geçiş yolu olarak nitelendirilebilir.



Şekil 1.2. Deriden emilim ve geçiş yolları (Moser ve ark., 2001)

### 1.2.1. Deriden Geçişi Etkileyen Faktörler

Sıvağ içerisindeki etkin madde konsantrasyonu doygunluk sınırlarına yaklaştıkça termodinamik aktivite yükselir ve etkin madde taşıyıcı sistemden kolaylıkla uzaklaşır (Liuzzi ve ark., 2016; Münch ve ark., 2017).

Sıcaklık artışı hem derinin hem de formülasyonun özellikleri gereği genellikle perkütan absorpsiyonu artıran bir faktördür. Bu durum formülasyondaki etkin maddelerin sıcaklıkla çözünürlüklerinin değişmesi ile açıklanabileceği gibi fizyolojik olarak sebum viskozitesinin düşüşü ve kan damarlarının genişlemesi sonucu dolaşımın artması ile de açıklanabilir.

Bir molekülün birbiri ile karışmayan iki faz arasındaki dağılımının ölçütü olan partiyon katsayısı deriden geçişi etkileyen bir diğer önemli faktördür. Transdermal taşıyıcı sistemlerde partiyon katsayısının hesaplanması için oktanol/su dağılım katsayısı kullanılır. Bu katsayı yardımı ile maddenin *stratum corneum* lipidleri ve su arasındaki dağılımı değerlendirilir. Maddenin yağ/su partiyon katsayısı arttıkça, lipid membrandan absorpsiyonu da artar. Kullanılan sıvağ ile *stratum corneum* lipidleri arasındaki partiyon katsayısı da sıvağın deriyi nemlendirme ve deriyi örtme özelliği, etkin maddenin deriye geçiş oranını önemli oranda etkiler.

Etkin maddenin deriden geçişinde temel engel *stratum corneum* tabakasıdır. Cilt yaralanmaları, cilt rahatsızlıkları, asitler, alkaliler ve bazı çözücülerle muamele gibi *stratum corneumun* bütünlüğünün bozulmasına yol açan durumlarda perkütan absorpsiyon artar. UV, IR ışınları ve iyonize radyasyondan etkilenmenin de penetrasyonu arttırdığı açıklanmıştır (Liuzzi ve ark., 2016; Münch ve ark., 2017).

Bebeklerin ve çocukların derisi yaşlıların ve yetişkinlerinkine göre daha geçirgendir. Bu durum, bebeklerdeki ve çocuklardaki derinin hidrasyonunun yaşlılara ve yetişkinlere oranla daha yüksek olmasına bağlanmaktadır.

Deriden geçişi etkileyen diğer özellikleri benzer olmasına rağmen, etkin maddelerin penetre olmasında bireyler arasında farklılıklar da gözlenmektedir (Liuzzi ve ark., 2016; Mnch ve ark., 2017).

### **1.3. Kozmetik rnlere Genel Bakış**

Amerikan Gıda ve İlaç dairesi (FDA) kozmetiği “vücuda uygulandıklarında, temizlik, güzellik, bakım, çekiciliği arttırmak gibi işlevlere yarayan ya da vücut görünümünü iyileştiren materyaller ya da ürünler” olarak tanımlamıştır. Kozmetik ürünlerde preparatın kozmetik özelliklerini belirleyen ayırt edici nokta, preparat ve içerisindeki bileşenler için öne sürülen kullanım amacıdır. Kozmetik rndeki herhangi bir bileşen, bir hastalığı önlemek, azaltmak, yok etmek ya da fizyolojik bir işlevi değiştirme amacı ile piyasaya verildiğinde ilaç olarak kabul edilir. Herhangi bir ürün eskiden beri ilaç özellikleri ile bilinen bir madde içeriyorsa ve tedavi edici özelliklerinden dolayı kullanılagelmişse, yasal olarak kozmetik kapsamında değerlendirilse ya da üreticisi tarafından ilaç endikasyonu verilmese dahi dermatolojik ilaç olarak sınıflandırılır (Kışlalıoğlu, 2016).

Bazı kozmetik preparatlar düşük konsantrasyonda etkin madde içermelerine karşın, yine de kozmetik olarak sınıflandırılırlar. Bu duruma verilebilecek bir örnek olarak ABD’de %2 ve %4 oranında hidrokinon içeren preparattır. Yüksek konsantrasyonu olan preparat melazma tedavisi için reçete edilirken, düşük konsantrasyonu olan preparat reçetesiz sunulmaktadır (Kışlalıoğlu, 2016).

Kozmetik ürünlere ait reglasyonlarda Avrupa Birliği, ABD ve Japonya temel merkezler sayılmaktadır. Avrupa birliği kozmetik yasası ile uyumlu olan ülkemizde, kozmetik ürünlerin güvenliği, etkililiği, etiket bilgilerinin doğruluğu, bileşenlerin saflık ve toksisitesinin kontrolü üretici sorumluluğuna bağlanmıştır. Ayrıca, kozmetik ürünler iyi üretim uygulamaları kılavuzuna uygun üretilmiş olmalıdır (Yönetmelik, 2005)

### 1.3.1. Kozmesötikler/Dermakozmetikler

Genellikle deriden geçemeyen iyonik ve çok büyük molekül yapısına sahip materyalleri derinin alt tabakalarına taşıyabilen mikro ve nano taşıyıcıların etkilerini dikkate alan bazı kozmetik bilimciler, literatüre kozmesötik (ilaç özellikli kozmetik) terimini kazandırmıştır (Kligman, 2000).

Kozmesötikler, “İstenilen kozmetik sonuca gösterdikleri fizyolojik etki ile ulaşan, deri ve deriye bağlı oluşumların yapı ve fonksiyonlarını olumlu yönde etkileyen madde ve ürünler” olarak tanımlanabilirler (Tarımcı, 2008)

Kozmesötik kelimesi, “kozmetik” ve “farmasötik” kelimelerinin birleştirilmesiyle meydana gelmiştir. Kozmesötik preparatlar hem kozmetik hem de ilaç özelliği taşır. Bu terim daha popüler olarak kullanılan dermakozmetik teriminin aynısıdır (Badıllı ve Tarımcı, 2016).

Dermakozmetik / kozmesötik etkin maddeler özellikle deri sağlığını sağlamayı hedefleyen preparatlardır. Çok kuru duyarlı, irrite olmuş, atopik, pürüzlü, sivilceli, çok yağlı, yaşlı, gevşemiş, sarkık ve pigment farklılıkları olan deriyi sağlıklı hale döndürme ve güzelleştirme çabaları sonucu ortaya çıkmış preparat grubudur.

Birçok kozmetik preparatın ilaç ile kozmetik arasında özellik gösterdiğini ve bazı ürünlerin kozmetik olarak sınıflandırıldığı halde, içlerinde bulunan pek çok maddenin inert olup, etkin madde içermese de derinin morfoloji ve fizyolojisinin etkileneceği savunulmuştur. Bu çeşit etkin madde ve preparatlar vücutta değişiklik yapmadıkları halde lokal olarak iyileştirici etki göstermektedir.

Japon kozmetik yasası vücudu çok az da olsa etkileyebilecek preparatları quasi-drug (ilaç benzeri) veya “kullanımı kısıtlanan ürün” olarak tanımlamaktadır (Ando ve ark., 2010). Bu grup içinde, akne karşıtı preparatları, florlu diş macunları, banyo

preparatları, antiperspiranlar, kepek önleyici şampuanlar ve bunların içinde kullanılan hammaddeler bulunmaktadır. Dolayısıyla kozmesötik tanımını Japonların “ilaç benzeri” tanımını ile örtüşmektedir.

Kozmesötik ürünler yüksek oranda bitkilerden ya da alglerden elde edilen ekstre, vitamin, enzim, peptit ve aminoasit gibi çok sayıda bileşenlerden oluşabileceği gibi, yalnızca birkaç vitamin ve nemlendirici benzeri az sayıda da etkin madde içerebilir. Kozmesötik ürünlerin çok satmasının nedenleri arasında, bir tek ürünün birkaç etkinliği bir arada göstererek, tüketicinin birden fazla satın aldığı kozmetik ürün giderlerinin azaltılması ve bu ürünlerin etiketinde belirtilmese dahi yaşlanmaya karşı olduğu inancıdır.

Kozmesötik ürünler günümüzde yürürlükte olan kozmetik yasa/yönetmeliklerinde tanımlanmamakla birlikte, bilinçli formülasyon yoğun farmasötik ve dermatolojik katkı ve ayrıntılı testlerle piyasaya sunulmakta ve tüketicinin beğenisi le popülerlik kazanmaktadır. Bu ürünlerin kullanımı hakkında tüketicinin aydınlatılması için verilen ek bilgiler kullanımını arttırmıştır.

### **1.3.2. Kozmesötik/Dermakozmetik Etkin Maddelerin Sınıflandırması**

Kozmesötik/Dermakozmetik maddeler doğal ya da sentetik kanyaklı olabilirler. Kozmesötik maddeler; antioksidan maddeler, vitaminler, peptitler, protein yapılı bileşikler, bitkisel maddeler, seramitler, biyofaktörler ve biyoteknoloji ürünleri gibi pek çok grupta sınıflandırılabilirler (Badıllı ve Tarımcı, 2016).

Antioksidan özellik gösteren maddeler kozmetik preparatlarda oksidasyonu önlemek için kullanılan maddelerdir. Antioksidan maddeler kozmesötik preparatlarda oksidasyonu engelleyerek preparatın kararlılığını artırmak yerine belirli bir fizyolojik görevi gerçekleştirmek için kullanılırlar.

Derideki yaşlanma sürecinde, diğer moleküller ile kolayca reaksiyona girebilen reaktif oksijen türevleri (ROS) sentezlenmektedir. Temel biyolojik moleküller olan lipid ve proteinler bu yapılar ile temas ettiklerinde hasar görebilir. Bu hasar elastin ve kolajen lifler üzerinde geri dönüşümsüz fizyolojik bozukluklara neden olmaktadır. Bu zararlı etkilerin bertaraf edilmesini sağlayan fizyolojik bir anti oksidan savunma mekanizması vardır. Bu mekanizma kabaca enzimatik ve enzimatik olmayan olarak gruplanabilir (Addor, 2017; Sen, 2016)

**Çizelge 1.1.** Derinin doğal antioksidan savunma mekanizmasında yer alan maddelerden bazıları

<b>Enzimatik</b>	<b>Enzimatik olmayan</b>
Glutasyon peroksidaz	C vitamini
Glutasyon redüktaz	E vitamini
Bakır Çinko süperoksit dismutaz	$\beta$ - karoten
Manganez süperoksit dismutaz	Malanin
Ekstraselüler süperoksit dismutaz	Koenzim Q10

Derinin antioksidan savunma mekanizması bazı nedenlerden dolayı ROS ile mücadele etmede yetersiz kalabilir. Bu durum oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır. Oksidatif stresin deri kanseri, foto yaşlanma ve vasküler hasar gibi pekçok duruma neden olduğu bildirilmiştir. Antioksidan maddeler toksik oksijen molekülü ve serbest radikalleri etkisizleştirerek oksidatif stresi önler. Antioksidan maddeler; antioksidan enzim (katalaz, glutasyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz gibi), zincir kırıcı antioksidanlar (A,C,E vitaminleri, flavonoidler ve  $\beta$ - karoten gibi), koruyucu antioksidan maddeler (metal bağlayıcı proteinler, transferrin ve laktoferrin gibi) olarak sınıflandırılabilirler.

Dermis tabakasında bulunan proteinik yapıdaki bileşikler esneklik ve pürüzsüzlük sağlar, ancak yaşlanma ile birlikte bu özellikler kaybolmaya başlar. Deride kolajen, elastin gibi proteinler bulunmaktadır. Kozmetik amaçla kullanılan

proteinler, nemlendirici özellik göstermeleri, yumuşaklık sağlamaları, hücre rejenerasyonunun sağlanması gibi amaçlarla deri üzerinde kullanılırlar.

Bitkiler içerisinde bulunan lipidler, esansiyel yağlar, flavonoidler ya da tanenler gibi maddelerden dolayı kozmetik preparatlarda yaygın olarak kullanılırlar. Kozmesötik maksatla kullanılan bitkisel maddeler genellikle antiinflammatuvar, antimikrobiyal ve yaşlanmaya karşı antioksidan etkisinden dolayı kullanılmaktadır. Kozmesötik preparatlarda çoğunlukla kullanılan maddeler arasında: aloe vera jeli, ginseng, ginko biloba, zerdeçal, meyan kökü, papatya gibi bitkiler yer almaktadır.

Seramik hücreler arası lipid içeriğinin yaklaşık yarısını oluşturan bir lipiddir. Kozmetik ürün formülasyonlarında derinin bariyer özelliğini ve nem içeriğini arttırmak amacıyla sıklıkla kullanılırlar. Saç üzerinde kullanımlarında ise koruyucu ve onarıcı özelliklerinden dolayı tercih edilirler.

Biyofaktörler, hayvansal dokulardan elde edilen, hücre yenilenmesini uyaran, doku uyarıcı ve iyileştirici etki gösteren, hücrelere oksijen taşınmasını artıran maddelerdir. Kozmesötik anlamda özellikle fibronektin ve kallikrein büyük önem taşır. Kozmesötik alanda kullanılacak biyofaktörün saflık, kararlılık ve geçimlilik konularında sorun çıkarmaması istenir.

#### **1.4. Kozmetik Taşıyıcı Sistemler**

Konvansiyonel ilaç ve kozmetik etkin madde taşıyıcı sistemleri çözeltiler, dispers sistemler ve yarı katı dozaj şekilleri olmak üzere üç temel gruba ayırabiliriz.

Kozmetik üretiminde en çok faydalanılan dispers sistemler iki fazlı sistemlerdir. Bunlara örnek emülsiyon ve süspansiyonlar verilebilir. Emülsiyonlar aynı ürün içerisinde hem yağda hem suda çözünen hammaddeleri içerirler. Kozmesötik



preparatlarda etkin maddenin deriye geçmesini kolaylaştırır. Kold krem ve stearat kremi kozmetik açıdan önemli emülsiyon sistemleri arasında gösterilebilir.

#### **1.4.1. Modern Kozmetik Taşıyıcı Sistemler**

Kozmetik alanda kullanılan aktif bileşiklerin stabilite problemlerinin giderilmesinde veya yüksek molekül ağırlığına sahip yeni nesil kozmesötik bileşenlerin uygulanmasında konvansiyonel taşıyıcı sistemlerin yetersiz kalması yeni arayışları gündeme getirmiştir. Modern taşıyıcı sistemler dediğimiz ve emülsiyon sistemler, veziküler sistemler, partiküler sistemler ve moleküler sistemler adı altında dört temel grupta toplayabileceğimiz taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir (Tarımcı, 2004).

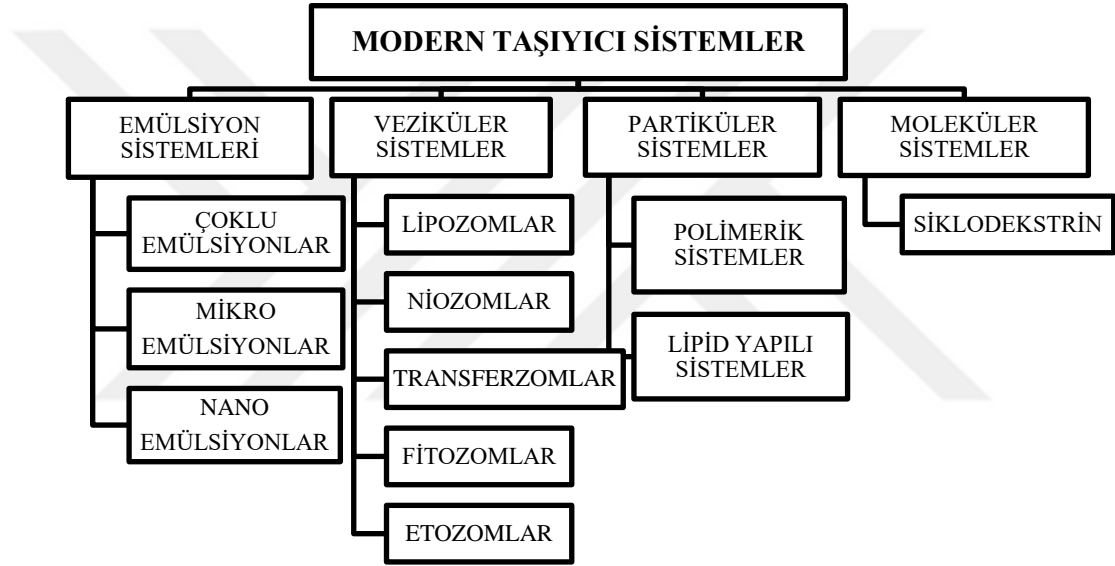
Kozmesötik aktif maddelerin modern taşıyıcı sistemler içinde verilmesindeki amaç etkin maddenin doğru konsantrasyonda, derinin doğru bölgesine ulaştırılması ve bu bölgede hedeflenen süre boyunca etkisini sürdürmesinin sağlanmasıdır (Tarımcı, 2004).

Modern taşıyıcı sistemler, kozmetik aktif bileşiklerin kontrollü salım şekillerinin hazırlanması böylece sürekli etkinin sağlanması, stabilite konusunda sorun yaşanan antioksidanlar ve vitaminler gibi maddelerin stabilitealarının arttırılması, deri tahrişi ve irritasyonun azaltılması ve hazırlanan ürünün estetik özelliğinin arttırılması gibi üstünlükler sunduklarından dolayı tercih edilmektedir. Nano taşıyıcı sistemler, parçacık büyüklükleri çok küçük olduğundan yüksek kimyasal reaktiviteye sahiptirler. Bu nedenle reaktif oksijen türevleri üretebilirler (Nel ve ark., 2006). Her nanotaşıyıcı sistem kendine özgü sorunlara sahip olabilir, örneğin bazı polimerik taşıyıcılarda biyouyumluluk sorunu gözlenirken, lipid yapıya sahip taşıyıcı sistemlerde oksidasyon sorunu ortaya çıkabilir.

### 1.4.2. Modern Kozmetik Taşıyıcı Sistemlerin Sınıflandırılması

Kozmetikte kullanılan modern taşıyıcı sistemler: emülsiyon sistemler, veziküler sistemler, partiküler sistemler ve moleküler sistemler olmak üzere dört ana grupta incelenebilirler (Tarımcı, 2004).

Modern kozmetik taşıyıcı sistemler değişik şekilde ve farklı büyüklükte olabilirler. Bu sistemlerin sınıflandırılması Şekil 1.3.'deki tabloda gösterilmiştir.



Şekil 1.3. Modern Taşıyıcı Sistemlerin Sınıflandırılması

Emülsiyon sistemlerinden nano boyutlara sahip olan nanoemülsiyonlar birbiri ile karışmayan iki fazın (su ve yağ), yüzey etkin madde ya da yardımcı yüzey etkin madde varlığında oluşturduğu, dağılan fazın nanometre büyüklüğünde ve küresel damlacık şeklinde bulunduğu, termodinamik olarak stabil ve transparan görümlü sistemlerdir.

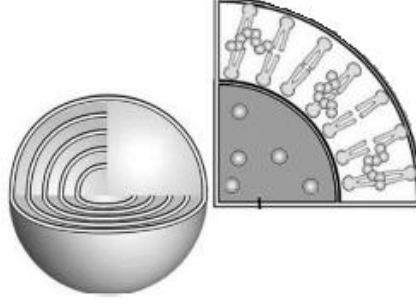
Nanoemülsiyonlar farmasötik amaçla olduğu kadar kozmetik amaçla da kullanılan, yüksek performanslı taşıyıcı sistemlerdir. Küçük ve uniform damla boyutlarına sahip oldukları için ve uygun akış özelliklerinden ötürü banyo yağları,

vücut kremleri, temizleyici kremler, yaşlanma karşıtı preparatlar gibi birçok kozmetik üründe sıklıkla kullanılırlar. Nanoemülsiyonlar, uygun lipidlerin deriye taşınabilmelerini sağlarlar. Bu sayede transepidermal su kaybını azaltıp cildin bariyer özelliğini desteklerler. Klasik emülsiyonlara ve mikroemülsiyonlara kıyasla nanoemülsiyonun birçok pozitif getirisi vardır (Costa ve Santos, 2017; Rai ve ark., 2018):

- Damlacık boyutlarının çok küçük olması damlacıkların sistem içinde asılı kalmasını sağlar. Bu durum stabilite problemi olarak görülen kremalaşma ve flokülasyonu uzun süre engeller.
- Dermal yolla uygulama yapıldığında nanometre büyüklüğündeki damlacıklar, taşıdıkları aktif madde ile birlikte derinin alt tabakalarına ulaşabilirler.
- Düşük yüzey gerilimine sahip olduklarından temas ettikleri yüzeyi ıslatma ve yüzeye yayılma özellikleri çok iyidir.
- Geniş yüzey alanları taşıdıkları aktif bileşenlerin emiliminin artmasını sağlar.
- Hazırlanmalarında çok düşük miktarlarda yüzey etkin madde kullanımı yeterlidir.
- Saydam ya da yarı saydam olmaları nanoemülsiyonlara estetik bir görünüm kazandırmakla birlikte krem, köpük ve sprey halinde preparatlarda taşıyıcı olarak kullanılırlar.
- Parfüm gibi uçucu özellikteki kozmetik ürünler için uygun bir sistemdir. Alkolsüz parfümlerin hazırlanmasına olanak sağlarlar.
- Sudaki çözünürlüğü düşük olan aktiflerin sulu ortamda taşınabilmesine imkân sağlarlar.

Veziküler sistemlerden en çok çalışma yapılan lipozomlar, küresel şekilli, bir veya daha fazla lipid çift tabakadan oluşan, orta iç kısmında ve tabakalar arasında sulu faz bulunduran kapalı veziküllerdir. Şekil 1.4.'de Lipozom şekli şematik olarak gösterilmiştir. Lipozomların temel yapı taşı fosfolipidlerdir. Fosfolipidler hem

hidrofilik (suda çözünen) hemde lipofilik (yağda çözünen, hidrofobik) kimyasal gruplar içeren amfifilik yapılarıdır.



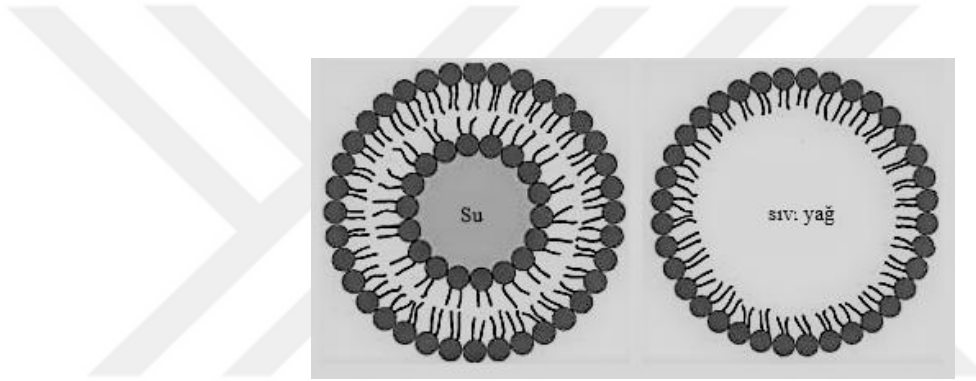
Şekil 1.4. Lipozom yapısı ve tabakaları

Lipozomlar hücresel yapıya benzediğinden dolayı topikal yolla kullanımda üstünlük sağlarlar. İçeriklerinden dolayı deride aktif madde birikimini arttırlar ve sistemik yan etki oluşma ihtimalini azaltırlar. Ayrıca hem hidrofilik hem hidrofobik maddelerin enkapsüle edilerek verilmesini sağlarlar. Bu karakteristik özellikleri lipozomları, vitaminler ve esansiyel molekülleri epidermisi onarmak amacıyla taşınmasında görev alan ideal bir taşıyıcı adayı yapmaktadır (Laouini ve ark., 2012; Müller-Goymann, 2004).

Lipozomlar biyoyumlu, biyobozunabilir, toksik olmayan ve esnek yapıda olduklarından birçok kozmesötik maddenin formülasyonunda kullanılmaktadır. Örneğin A, E ve K vitaminleri ve karotenoidler, likopen ve koenzim Q10 gibi antioksidanlar bu kozmesötiklere örnek olarak gösterilebilirler. Ayrıca kolesterol ve seramidler gibi normal derinin bileşiminde bulunan maddeler, yıllardır topikal deri kremlerinde hidrasyonu sağlamak, deri yüzeyini daha yumuşak ve pürüzsüz hale getirmek amacıyla lipozom formülasyonlarında kullanılmaktadır (Lohani ve ark., 2014).

Farmasötik ya da kozmesötik anlamda pek çok üstünlük gösteren lipozomal sistemler, depolama sırasında düşük stabilite gösterebilirler. Hidroliz veya oksidasyon reaksiyonları sonucu parçalanabilir, sedimentasyona veya agregasyona uğrayabilirler. Enkapsüle edilmiş aktif maddeler sızıntı yapabilmekte veya füzyon tepkimesi gerçekleştirebilmektedir. Bunların yanı sıra lipozomların üretim maliyetleri yüksektir (Akbarzadeh ve ark., 2013).

Nanoemülsiyon ve lipozomların yapısal farklılıkları Şekil 1.5'te gösterilmektedir (Tadros ve ark., 2004).



Şekil 1.5. Nanoemülsiyon ve lipozomların yapısal farklılıkları

Nanokapsüller, aktif maddeler için sıvı bir depo görevi gören yağlı bir çekirdekten ve koruyucu bir zar rolü oynayan polimerik bir kabuktan meydana gelen, 1000 nm'den küçük, küresel, kolloidal sistemlerdir. Aktif maddeler genellikle iç çekirdekte çözülmüş veya dağılmış halde bulunabildikleri gibi yüzeye adsorbe ya da konjuge halde de bulunabilirler (Poletto ve ark., 2011).

Polimerik partiküler sistemlerden olan nanokapsüller kontrollü salım yeteneklerinden ve aktif maddelerin penetrasyon veya permeasyon parametrelerini değiştirebilme özelliklerinden ötürü taşıyıcı sistem olarak avantaj sağlarlar. Bu özellikleri, formülasyonun kalitatif ve kantitatif kompozisyonlarının modifiye edilmesini sağlamaktadır. Ayrıca nanokapsüllere yüksek miktarda aktif madde yüklenebilmektedir. Nanokapsüllerin sulu dispersiyonları direkt olarak cilde

uygulanabildiği gibi yarı katı, hidrojel ve emuljel olarak da uygulanabilirler (Huynh ve ark., 2009; Poletto ve ark., 2011).

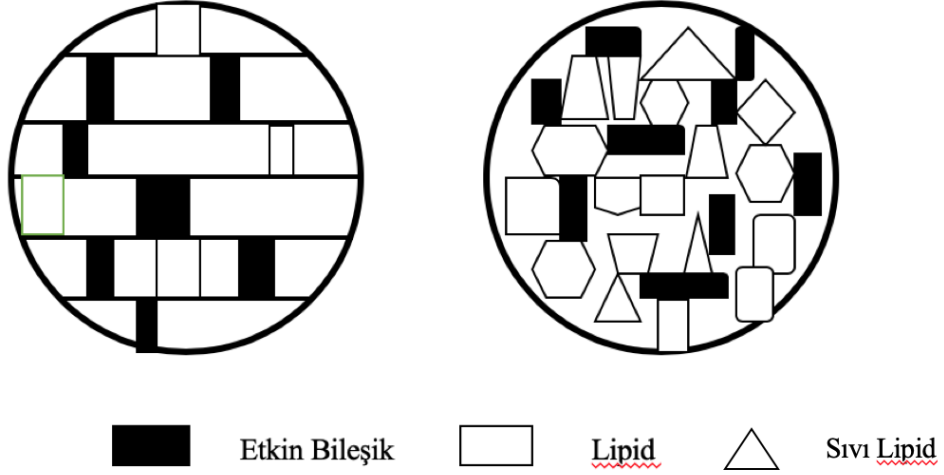
Son grupta yer alan moleküler taşıyıcı sistem siklodekstrinlerdir. Bunlar nişastanın enzimatik yıkımı sonucunda ortaya çıkan siklik oligosakkaritlerdir. Diğer taşıyıcı sistemlerden farklı olarak toroidal (içi boş kesik koni) şekillidirler. Kozmetiklerde hem bir etkin bileşik yüklenmemiş olarak hem de kozmesötik aktif maddelerle oluşturdukları inklüzyon kompleksleri kullanılmaktadır.

### **1.4.3. Kozmetik Taşıyıcı Sistem Olarak Lipid Nanopartiküller**

Geleneksel kolloidal taşıyıcı sistemlere alternatif olarak ortaya çıkan katı lipid nanopartiküller (SLN) ve nano yapılı lipid taşıyıcılar (NLC) günümüzde farmasötik ve kozmesötik alanda oldukça yoğun bir ilgi görmektedir. Tarihsel açıdan bakıldığında, SLN'ler Prof. Müller ve Prof. Gasco'nun bireysel patent başvuruları sonucu 90'lı yıllarda ortaya çıkmıştır (Gasco, 1991; Lucks ve Muller, 1991). 2000'lerin başında, SLN'lerin ikinci jenerasyonu olan NLC'ler, SLN'lerin bazı sınırlı kullanımlarının üstesinden gelmek için Prof. Müller tarafından tanımlanmıştır (Muller ve ark., 2002a, 2002b).

SLN'ler, yağ/su emülsiyonlarının sıvı lipid olan kısmının oda ve vücut sıcaklığında katı olan lipid veya katı lipidlerin karışımı ile yer değiştirilmesi ile üretilen sistemlerdir. NLC'ler ise uzun zincire sahip katı lipid ve kısa zincirli sıvı lipid karışımlarını 70:30 ile 99,9:0,1 arasındaki oranlarda içeren sistemlerdir. SLN'nin kusursuz matris yapısı etkin madde moleküllerinin sistemin içine girip yüklenmesini zorlaştırır. Bu durum da SLN'lerde düşük yükleme kapasitesi ve ürünün rafta bekleme esnasında etkin maddenin taşıyıcı sistemden dışarı sızması gibi problemleri beraberinde getirir. NLC sistemlerde katı ve sıvı lipidlerin karışımlarının oluşturduğu daha esnek bir sistem söz konusudur. Bu nedenle NLC'lere etkin madde yükleme

kapasitesi daha yüksektir (Pardeike ve ark., 2009). NLC ve SLN arasındaki yapısal farklılık şematik olarak Şekil 1.6.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.6. SLN ve NLC arasındaki yapısal farklılıklar

#### 1.4.4. Lipid Nanopartiküllerin Avantaj ve Dezavantajları

SLN ve NLC'ler geleneksel kolloidal taşıyıcı sistemlere göre birtakım avantajlara sahiptir (Mehnert ve Mader, 2012; Numanoğlu ve Tarımcı, 2006). Bunlar;

- Kararlı sistemlerdir ve homojen bir partikül büyüklüğü dağılımında üretilebilirler.
- İntravenöz, peroral, dermal ve topikal olmak üzere geniş bir potansiyel uygulama spektrumuna sahiptirler.
- SLN ve NLC'ler yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahiptir.
- Su çözünürlüğü yüksek ya da düşük etkin maddeler için uygun ilaç taşıyıcı sistemlerdir.
- İlaç salımını değiştirerek ve doku dağılımını iyileştirerek ilaçların biyoyararlanımını artırırlar.
- Birkaç hafta boyunca sürekli ilaç salımı sağlayabilirler.

- Birtakım işlemler uygulanarak fizikokimyasal özelliklerin modifiye edilmesiyle, SLN ve NLC'ler etkin maddelerin spesifik organlara veya hücrelere hedeflendirilmesinde rol oynarlar.
- SLN ve NLC bileşenleri, düşük toksisiteye sahiptir. Yüksek erime noktalı kısa ve orta uzunlukta zincir trigliseritleri, fosfolipidleri ve GRAS statüsüne sahip farmasötik ve kozmetiklerde kullanılan katı lipidleri içermektedir.
- Vücutta uzun süre dolaşabilen biyouyumlu sistemlerdir ve sitotoksik etki göstermezler.
- Büyük ölçekli üretime uygun, düşük maliyetli ve tekrarlanabilir bir teknik olan yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi ile üretilebilirler.
- Yüksek basınçlı homojenizasyon tekniği ile organik çözücülerin kullanılmasına gerek duyulmaz.
- 0.22 mikrometrenin altındaki nanopartikülleri içeren dispersiyonlar membran filtrasyon tekniği ile sterilize edilebilirler.

SLN ve NLC'lerin kullanımını sınırlandıran bazı faktörler de mevcuttur. Bunlar:

- Uzun süre saklanmalarında oluşabilen polimorfik geçişlerin etkisiyle, yüklenen madde lipid nanopartiküllerden dışarı sızabilmektedir.
- Ortamda lipid nanopartikül dışında kolloidal özellikte partiküller yer alabilir.
- Stabilitiyi etkileyen en önemli faktör olan su içeriği dispersiyonlarında nispeten fazladır.



#### 1.4.5. Lipid Nanopartiküllerin Hazırlama Yöntemleri

Yüksek hızda homojenizasyon ve ultrasonikasyon, lipid nano dispersiyonlarının üretimi için kullanılan tekniklerdir. Bu yöntemler ayrı ayrı kullanılabilir gibi birlikte de kullanılabilir. Her iki yöntemde de yağ fazı erime derecesinin üzerine ısıtılarak, aynı sıcaklıktaki su fazı ile yüksek kayma hızına sahip bir homojenizatör yardımıyla bir süre karıştırılır ve/veya sonikasyon işlemi uygulanır. Her iki yöntem de yaygın ve kullanımı kolaydır. Bununla birlikte, dispersiyon kalitesi çoğu zaman mikropartiküllerin varlığı ile tehlikeye girer. Ayrıca, ultrasonikasyon yöntemi ile üretim yapılıyor ise metal kontaminasyonunun dikkate alınması gerekir (Mehnert ve Mader, 2012).

Yüksek basınçlı homojenizasyon (HPH) yöntemi, SLN'lerin hazırlanmasında güvenilir ve güçlü bir tekniktir. HPH, parenteral beslenmede kullanılan nanoemülsiyonların üretimi için yıllardır kullanılmaktadır (Lippacher ve ark., 2000). Yüksek basınçlı homojenizatörler, sıvının dar bir aralıktan (birkaç mikron aralığında) yüksek basınç (100-2000 bar) uygulayarak geçmesini sağlar. Böylece, akışkan çok yüksek bir hızla, kısa bir mesafede (1000 cm / s'in üzerinde) ulaşır. Çok yüksek kayma gerilimi ve kavitasyon kuvvetleri partikülleri submikron aralığına indirir.

SLN üretimi için kullanılan HPH yöntemi kendi içinde, sıcak ve soğuk homojenizasyon olmak üzere ikiye ayrılır. Her iki durumda hazırlama sürecinde etkin madde, lipid eriyik içinde eritilerek veya dağıtılarak eklenebilir ya da yüzey aktif madde içeren sulu kısımda çözülebilir (Mehnert ve Mader, 2012).

Sıcak homojenizasyon, lipidin erime noktasının üzerindeki sıcaklıklarda gerçekleştirilir. İlk aşama olarak sıcak lipid eriyiği ve aynı sıcaklıktaki sulu emülsiyon yapıcı fazın birbiri içinde karıştırılması ile ön emülsiyon/kaba emülsiyon elde edilir. Ön emülsiyonun kalitesi, nihai ürünün kalitesini büyük ölçüde etkiler. Genelde yüksek sıcaklıklar, iç fazın viskozitesinin azalması nedeniyle daha düşük parçacık boyutlarına neden olur.

Soğuk homojenizasyon işleminde katı lipid ile sulu YAM dispersiyonu yüksek basınçlı homojenizatör ile öğütülerek submikron düzeye getirilir. Homojenizasyon sırasındaki sıcaklık artışından dolayı lipidin erimiş halini dengelemek için etkin sıcaklık kontrolü ve düzenlemesi gereklidir. Soğuk homojenizasyon tekniği, sıcaklığa bağlı ilaç bozulması, homojenleştirme sırasında etken maddenin sulu faza kaçışı, kristalleşme basamağında çeşitli modifikasyonların oluşması gibi sıcak homojenizasyon tekniğinde karşılaşılan problemlerin üstesinden gelmek için geliştirilmiştir. Genel olarak, sıcak homojenizasyon ile karşılaştırıldığında, soğuk homojenizasyon tekniği uygulanan numunelerde daha büyük parçacık boyutları ve daha geniş bir boyut dağılımı gözlenir (Mehnert ve Mader, 2012).

Sjöström ve Bergenståhl tarafından tanımlanan çözücü emülsiyonlaştırma/buharlaştırma yönteminde; lipofilik materyal, su ile karışmayan bir organik çözücü (örneğin sikloheksan) içinde çözündürülerek sulu bir fazda emülsifiye edilir. Kullanılan organik çözücünün buharlaştırılmasından sonra, lipidin sulu ortamda çökeltmesi ile bir nanopartikül dispersiyonu oluşur (Sjöström ve Bergenståhl, 1992).

Mikroemülsiyonların seyreltilmesi ile birlikte lipid nanopartikül hazırlanması yöntemi Gasco ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Optik olarak saydam mikroemülsiyonlar 60- 70 °C de düşük erime derecesine sahip yağ asitleri, yüzey aktif madde ve/veya yardımcı yüzey aktif madde ve su kullanılarak oluşturulur. Sıcak mikroemülsiyon, soğuk suya 1:25 ila 1:50 hacim oranında eklenerek lipid nanopartiküller oluşturulur (Fadda ve ark., 2013).

#### **1.4.6. Lipid Nanopartiküllerin Karakterizasyonları**

“Foton korelasyon spektroskopisi (PCS)” ve “lazer kırınımı (LD)”, partikül büyüklüğünün rutin ölçümleri için kullanılan en güçlü tekniklerdir. Coulter Counter yöntemi, küçük nanopartiküllerin değerlendirilmesindeki zorluklar ve kolloidal

dispersiyonları dengesizleştirebilecek elektrolit gereksinimi nedeniyle nano partiküllerin büyüklüğünü ölçmek için nadiren kullanılır.

“Dinamik ışık saçılımı” olarak da bilinen PCS yöntemi parçacık hareketinin neden olduğu, saçılan ışığın yoğunluğundaki dalgalanmayı ölçer. Bu yöntem birkaç nanometreden yaklaşık 3 mikrona kadar bir boyut aralığını kapsar, ancak PCS daha büyük mikropartikülleri tespit edememektedir. Daha büyük partiküller, lazer kırınımı yöntemi ölçümleri ile tespit edilebilirler. Bu yöntem, kırılma açısının parçacık yarıçapına olan bağıntısına dayanmaktadır. Her iki yöntemin de partikül boyutlarını “ölçemediği” unutulmamalıdır. Aksine, parçacık boyutlarını hesaplamak için kullanılan ışık saçılma etkilerini tespit ederler.

Nanopartiküller sistemlerin karakterizasyonunda, atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile karakterizasyon yöntemine olan ilgi artmaktadır. Bu teknik, görüntüleme için 0.01 nm'ye kadar olan uzamsal çözünürlükle sonuçlanan bir yüzey ve bir prob ucu arasında hareket eden kuvveti kullanır. AFM'nin en çarpıcı avantajı, işlem sırasında vakum gerekmediğinden ve numunenin iletken olması gerekmediğinden, numune hazırlamanın basitliğidir. Böylece, orijinal olarak hidratlanmış, çözücü içeren numunelerin doğrudan analizi için kullanım potansiyeline sahiptir. Biyolojik bileşikler için, yıkanmış bir mikroskop lamı üzerine veya bir mika substratı üzerine bir çözelti damlası ya da bir numunenin dispersiyonunu yerleştirerek numune hazırlanabilir (Drake ve ark., 1989; Kirby ve ark., 1995).

“Transmisyon Elektron mikroskobu” (TEM) analizlerinde termoplastik reçineler - polivinil formal türevi kaplanmış bakır ızgara üzerine yerleştirilen nanopartiküller kurutulduktan sonra, bazı durumlarda osmiyum tetraoksit ile sabitlenerek, üzerine elektron ışını gönderilir ve görüntüleme yapılır. TEM uygulamasının en büyük yararı ince yüzeylerde ya da kristallografik analizlerde hassas iki boyutlu görüntülemeye olanak tanınmasıdır (Salome Amarachi ve ark., 2014; Salvi ve Pawar, 2019).

“Taramalı elektron mikroskobu” (SEM), yüksek çözünürlüklü görüntü oluşturmak için vakumlu ortamda elektromagnetik lenslerle inceltelen elektron demeti ile görüntüleme imkânı sunar. Görüntüler, elektron demetinin malzeme ile olan etkileşiminden ortaya çıkan ışımlar ya da geri yansıyan elektronlar sayılarak oluşturulur. SEM analizi yapılacak nanopartiküller, uygun bir zemin üzerine damlatılır, kurutulur ve üzerine altın kaplanır. Hazırlanan örneğin üzerine elektron ışını gönderilmesi ile yüzey görüntülemesi yapılır. SEM uygulaması ile üç boyutlu görüntü almak mümkündür (Salome Amarachi ve ark., 2014; Salvi ve Pawar, 2019).

“Diferansiyel taramalı kalorimetre” (DSC) ve “X ışını saçılması”, lipidin fiziksel durumunu araştırmak için yaygın olarak kullanılır. DSC, farklı lipid modifikasyonlarının farklı erime noktalarına ve erime entalpilerine sahip olması nedeniyle lipidin morfolojisi hakkında bilgi edinilmesini sağlar. X ışını saçılması ile de lipid kafesin uzun ve kısa aralıklarının uzunluğunu değerlendirmek mümkündür. Nanopartiküler dispersiyonların kendilerinin ölçülmesi şiddetle tavsiye edilir, çünkü solvent uzaklaştırılması modifikasyon değişikliklerine yol açabilir (Westesen ve ark., 1993).

#### **1.4.7. Lipid Nanopartikülle Hazırlanan Piyasa Preparatları**

Lipid nanopartiküller kullanılarak hazırlanan kozmetik preparatlar genellikle krem şeklinde olmakla beraber, daha düşük viskoziteli emülsiyon, serum ya da balsam şeklinde olabilmektedir. Kozmetik pazarı araştırıldığında koenzim Q10 içeren ürünler sıkça göze çarpmaktadır. Bunlardan en bilineni içerisinde antioksidan özellikli Dr.Rimpler’in Cutanova Cream Nanovital Q10 ve Intensive Serum Nanorepair Q10 kremi ve serumudur (Muller ve ark., 2007). Bu formüller aktif bileşen ile birlikte bitkisel ekstraktlar da içermektedir. Daha derin etki ve onarım sağlamak amacıyla yüksek aktiviteli oligosakkaritler ile birlikte yine koenzim Q10 kombinasyonları NLC taşıyıcılar içerisine yüklenerek piyasaya sunulmuştur. Beate Johnen markasına ait derin etkili serum ve kremler buna örnek olarak verilebilir.

Hindistan cevizi yağı kullanılarak çoğunlukla yeşil çay ve manolya gibi bitkisel ekstrelerin yüklendiği nanopartiküller taşıyıcılar kozmetik ürün olarak piyasada yer almaktadır. Buna örnek olarak, Isabelle Lancray firmasına ait Surmer Krem serileri gösterilebilir. Ayrıca cilt üzerindeki yenileyici etkiyi artırmak amacıyla yine aynı ürün grubuna peptitler de eklenmiştir.

Zeytinyağı kullanılarak NLC şeklinde hazırlanan preparatlar da kozmetik piyasasında göze çarpmaktadır. Dr. Thesis firmasına ait serum ve balsamlar buna örnek olarak gösterilebilir. İçerik olarak Zeytinyağı haricinde; pantenol, tokoferil asetat ve bir takım bitkisel ekstreler bu ürün grubunda yaşlanma ve kırışıklık önleyici olarak kullanılmıştır.

### **1.5. Tasarımla Kalite Yaklaşımı**

Ön formülasyon çalışmalarından bitmiş ürüne kadar süregelen farmasötik gelişim yoğun ve oldukça karmaşık bir işlemler bütünüdür. Ancak, geliştirilen farmasötik ürün her durumda hasta için belirli kalite düzeyini sağlamalıdır. Çünkü ürün kalitesindeki ufak kusurlar terapötik performansı etkileyecek durumları ortaya çıkarabilir. Gelişen teknolojik ilerlemelere rağmen, ilaç endüstrisi halen geleneksel ürün gelişimi sürecini kullanmaktadır. Geleneksel formülasyon geliştirme yaklaşımında; ürünün kalitesi hammadde kontrolleri, ürün imalat kontrolleri, proses kontrolleri ve bitmiş ürün kontrolleri ile sağlanabilir. Test ile kalite (QbT) adı verilen bu yaklaşımda ürün özellikleri ve ürün kalitesi arasındaki bağlantının tespiti zordur ve kalitesi garanti edilemez (Aksu ve ark., 2013).

Test ile kalitedeki sorunlar, ilaç endüstrisinde modernleşme çalışmalarını doğurmuş ve FDA ilk adımı atarak ürün kalitesini daha da geliştirmek modernize etmek amacı ile Güncel İyi Üretim Uygulamaları'nda (cGMP) yenilikleri ilaç endüstrisine duyurmuştur. QbD yaklaşımı ve prensibi ise ilk olarak 2004 yılında FDA tarafından yayınlanan PAT klavuzunda değinilmiş fakat ABD, Japonya ve Avrupa'nın ruhsatlandırma kuruluşlarının bir araya gelmesi ile oluşan ICH forumu tarafından 2005

yılında yayınlanan ICH Q8 Farmasötik Gelişim Klavuzu ile birlikte *QbD – Tasarımla kalite* kavramı da tam anlamıyla hayat bulmuştur. ICH Q8 klavuzu, ilacın kendisinde ya da üretim prosesinde esneklik sağlamak amacı ile tasarımla kalite yaklaşımının prensiplerini açıklamaktadır. QbD yaklaşımının ilkelerini ve uygulamasını açıklayan bu klavuz ilaç üretimindeki belirsizlikleri ve riskleri azaltarak aynı zamanda geliştirilen ilaç için sürekli iyileştirmeyi de sağlamakta böylelikle ilacın onay prosedüründe kolaylıklar da elde edilebilmektedir (Mesut ve ark., 2015; Pramod ve ark., 2016).

Farmasötik gelişimde test ile kalite ve tasarımla kalite arasındaki temel farklılıklar Çizelge 1.2’de sunulmuştur (Mishra ve ark., 2018; Yu, 2008; Zhang ve Mao, 2017).

**Çizelge 1.2.** Farmasötik gelişimde tasarımla kaliteye karşı test ile kalite

<b>QbT</b>	<b>QbD</b>
Ampirik yaklaşım	Sistemik ve mekanistik yaklaşım
Kalite bitmiş ürün kontrolleri ile sağlanır	Kritik kalite özelliklerinin ve kritik işlem parametreleri ve kritik materyal özellikleri arasındaki ilişkinin bilimsel anlayışına dayalı kalite
Ürün geliştirmede her seferinde tek değişkenin kullanılır	Çok değişkenli deneyler ile kalite tasarlanır
İşlem içi testlere göre devam edilir ya da başa dönülür. Bitmiş ürün optimizasyonuna ve tekrarlanabilirliğe odaklanmıştır	DoE, PAT teknolojisi, modelleme yöntemleri ile değişkenler arası ilişki yorumlanabilir
İşlem değişikliklerden kaçınır; gerekli değişiklikler yapılması durumunda otoriteye ayrıntılı rapor sunulur. Sürekli iyileştirme için ruhsatlandırma engeli bulunmaktadır.	Tasarım alanı oluşturulabilir. Tasarım alanı içinde değişiklik yapıldığında, ruhsatlandırma otoritelerinin iznini almaya gerek yoktur.

Genel anlamda QbD, bitmiş ürün için önceden tanımlanmış kaliteyi sağlamak amacıyla formülasyonlar ve üretim süreçleri tasarlamayı ve geliştirmeyi ifade eden sistematik, bilimsel, risk bazlı bir yaklaşımdır (Aksu ve ark., 2012; Zhang ve Mao, 2017). Kalitenin bitmiş üründe test edilemeyeceği, ürün tasarlanırken inşa edilmesi gerektiğini savunan QbD yaklaşımının en temel amacı kaliteli bir ürün tasarımı ve onun üretim süreci boyunca beklenen performansını korumasını sağlamaktır

(Guideline, 2009). Bu amaçla sistematik olarak takip edilmesi gereken QbD adımları aşağıda özetlenmiştir.

QbD uygulamalarındaki adımlar:

- “Bilgi alanının oluşturulması”
- “Hedef ürün kalite profilinin belirlenmesi” (QTPP)
- “Kritik kalite özelliklerinin belirlenmesi” (CQA)
- “Kritik işlem parametrelerinin belirlenmesi” (CPP)
- “Kritik materyal özelliklerinin belirlenmesi” (CMA)
- Formülasyonun tasarlanması ve kontrol stratejisinin geliştirilmesi
- Tasarım alanının oluşturulması

QbD yaklaşımı hedef ürün kalite profili (QTPP) için önemli olan kritik kalite özellikleri (CQA'lar) ve kritik işlem parametreleri (CPP'ler) ile kritik materyal özellikleri (CMA'lar) arasındaki ilişkiyi anlamak ve kontrol etmek üzerine kurulu olduğundan ilk basamak bilgi alanının oluşturulmasıdır. Bu basamakta varolan teorik bilgiler toplanır. Kullanılan etkin ve yardımcı maddelerin fizikokimyasal özellikleri, işlem değişkenleri, test yöntemleri, kullanılacak aletler, metot gibi değişkenler incelenerek hasta şikayetleri değerlendirilir.

Kantitatif bilgiler sunan hedef ürün kalite profili (QTPP), üründen beklenen terapötik yararı elde edebilmek için ürünün taşınması gereken özellikler bütünü olarak tanımlanır ve hasta ve hastalık merkezli bir kavramdır. Ürünün uygulama yolu, dozaj şekli, taşıyıcı sistemi, salım profili gibi bazı temel fizikofarmasötik parametreleri dikkate alır ve ürünün kalite, güvenlik ve etkinliğini garanti altına alan hasta ve hastalık merkezli bir kavramdır.

Bu adımdan sonra belirlenen tüm parametreler QTPP’i doğrudan etkiliyorsa kritik, etkilemiyorsa kritik olmayan bir parametre olarak tanımlanır. ICH Q8 (R2) Farmasötik Gelişim Klavuzundaki tanıma göre kritik kalite özellikleri “İstenilen ürün

kalitesini elde edebilmek için uygun limit ve aralıklar içinde, kontrol edilmesi gereken fiziksel, kimyasal, biyolojik mikrobiyolojik ürün özellikleri ve karakteristikleridir” (Guideline, 2009). Geliştirilen ideal dozaj formunun temelini hedef ürün kalite profili ve kritik kalite özelliklerinin ikisi birden oluşturur.

Tasarlanan formülasyona ait kritik parametreler ise kritik işlem parametresi ve kritik materyal özellikleri olarak ikiye ayrılabilir. İstenilen ürün kalitesini ve prosesin tutarlılığını sağlayabilmek için kontrol edilmesi gereken prosesin ölçülebilir herhangi bir adımı kritik işlem parametresi (CPP) olarak tanımlanırken; istenilen ürün kalitesini sağlayabilmek için kontrol edilmesi gereken girdi materyallerinin fiziksel, kimyasal, biyolojik özellikleri ya da karakterleri de kritik materyal özellikleridir (CMA).

QbD yaklaşımı kapsamında hedef ürün kalite özelliklerine ulaşabilmek için gerekli tüm kritik parametreler belirlendikten sonra formülasyonun geliştirmesi ve incelenmesi sözkonusudur. Bu amaçla kontrol stratejisi geliştirilmelidir. Kontrol Stratejisi ICH Q10 Farmasötik Kalite Sistemleri klavuzuna göre güncel ürün ve proses bilgilerinden çıkarılan; proses performansını ve ürün kalitesini güvence altına alan planlı bir kontroller seti olarak tanımlanır (Guideline, 2008). QbD yaklaşımının en önemli basamaklarından biri veri analizi kısmıdır. Elde edilen sonuçların kritik kalite özellikleri ile uyumunun araştırılması aşaması olan veri analizi hammadde, formülasyon parametresi, işlem değişkenleri ve bitmiş ürün spesifikasyonlarının değerlendirilmesinde kullanılır. Veri analizi teknikleri sayesinde Kritik işlem parametreleri/kritik materyal özellikleri ile kritik kalite özellikleri arasında ilişki analizlenir ve fonksiyonel bağlantılar kurulur.

Ürünün performansını etkilediği gösterilen materyal özellikleri ile işlem parametrelerinin etkileşimi ve kritik kalite özellikleri arasındaki çok fonksiyonlu ilişkileri yani hedef ürün kalite profilini sağlayan kalitesi garanti altına alınmış ürünün elde edilebileceği alan ICH Q8 R2 klavuzuna göre tasarım alanı olarak tanımlanmaktadır. Tasarım alanı limitleri girdi materyallerinin aralıkları şeklinde verilebileceği gibi proses parametreleri şeklinde de ifade edilebilir (Bastogne, 2017). QbD adımları arasında yer alan tasarım alanı operasyonel esneklik sağlamak açısından



oldukça faydalı olmasına rağmen QbD çalışmalarında tasarım alanı oluşturularak kalitenin garanti altına alınması zorunlu değildir (Guideline, 2009).

### 1.5.1. Yapay Zeka Araçları

Bu çalışmada QbD temelli formülasyon optimizasyonu yapay zeka araçları kullanılarak yapılmıştır.

Farmasötik gelişim kapsamında formülasyon geliştirme, aktif bileşenlerin, yardımcı maddelerin veya üretim yönteminin karmaşık değişkenlerini içerdiğinden; ürünün tüm değişkenleri detaylandırılmalıdır. Deney Tasarımı (DoE) ve Cevap Yüzey Metodolojisi (RSM), geleneksel deneysel temelli formülasyon geliştirme yerine 2000'lerin başından beri en sık kullanılan optimizasyon yöntemleridir. Her iki yöntemde de optimize edilmiş formülasyon denklemlerle oluşturulabilir ve değişkenler arasındaki ilişki matematiksel ve istatistiksel tekniklerle analiz edilebilir. Teknolojinin gelişmesiyle birlikte ise, istatistiksel deneysel tasarım, yapay zeka gibi bilgisayar tabanlı araçlar ile birleştirilmiştir. Bu makine öğrenme konsepti, ürün geliştirmeyi iyileştirmek için benzersiz çözümler sunar. Yapay sinir ağları (YSA), bir dizi matematiksel denklemlerle tanıma, anlama, öğrenme, yeni bilgiler üretme gibi biyolojik süreçleri simüle eden yapay zeka temelli bilgisayar sistemleri arasındadır. Bir veya çok tabakada düzenlenen ve ağırlıklı bağlantılarla birbirine bağlanmış biyolojik nöronların işlevselliğinde yapay nöron adı verilen çok sayıda birbirine bağlı eleman içerir. Yapay sinir ağları ayrıca bağımlı ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi karmaşık denklemler kullanmadan tespit etmek için faydalı olabilir. Sonuç olarak, YSA, karmaşık doğrusal olmayan problemleri çoklu değişken ve çoklu çözümler ile analiz etmek için iyi tanımlanmış bilgisayar temelli sistemlerdir (Agatonovic-Kustrin ve Beresford, 2000; Balfagón ve ark., 2010; Djekic ve ark., 2011).

Yapay sinir ağları doğal nöronlardan ilham alan bir bilgisayar programı modelidir. Doğal nöronlar, nöronun dendritlerinde veya zarında bulunan sinapslardan

sinyal alırlar. Alınan sinyaller yeterince güçlü olduğunda (belirli bir eşiği aştığında), nöron aktive olur ve aksondan bir sinyal alır. Bu sinyal başka bir sinaps için gönderilebilir ve diğer nöronları aktive edebilir. Yapay nöronların modellenmesinde ise gerçek nöronlardan ilham alınmıştır. Bunlar temel olarak ilgili sinyallerin gücü oranında katlanarak nöronun aktivasyonunu belirleyen matematiksel bir fonksiyonla hesaplanan girdilerden (sinapslar gibi) oluşur. Başka bir işlev yapay nöronun çıktısını hesaplar. YSA'lar, bilgiyi işlemek için yapay nöronları birleştirir. Yapay sinirin ağırlığı ne kadar fazla ise girdinin gücü bundan dolayı katlanacaktır.

Yapay bir nöronun ağırlığını ayarlayarak, belirli girdiler için istenilen çıktı elde edilebilir. Fakat yüzlerce veya binlerce nörondan YSA aldığımızda, gerekli tüm ağırlıkları elle bulmak oldukça karmaşık olabilir. Ancak, ağdan istenen çıktıyı elde etmek için YSA'nın ağırlıklarını ayarlayabilen algoritmalar bulunabilir. Bu ağırlık ayarlama sürecine öğrenme veya eğitim denir. YSA türlerinin sayısı ve kullanımları çok yüksektir. Bunlar arasındaki farklılıklar; işlevler, kabul edilebilir değerler, topoloji veya öğrenme algoritmaları vb. olabilir. Bu sistemlerin en önemli avantajı katı kurallara sahip deneysel tasarım gerektirmemesi ve geçmiş ya da eksik verileri de kullanarak sonuca ulaşabilmesidir. İstatistiksel modelden ayrılan en büyük özelliği ise spesifik matematiksel fonksiyonlar olmadan bağımlı ve bağımsız değişken arasındaki ilişkiyi genelledebilmesidir. Bu nedenle YSA çok değişkenli ve çok yanıtı non lineer problemlerin çözümünde oldukça başarılıdır (Takayama ve ark., 2003).

## 1.6. Selülit

“Selülit” terimi ilk olarak 150 yıl önce Fransız literatüründe kullanılmaya başlanmıştır, ancak günümüzde tıp literatüründe bu durum dermo-panniculois, adiposis edematosa veya gynoid lipodistrofi olarak ifade edilmektedir (Avram, 2004).

Selülit, ağırlıklı olarak kadınlarda, cinsiyet hormonlarının etkileriyle oluşan ve vücudun en çok pelvik bölge, karın ve alt ekstremitelerinde gözlenen, derinin portakal kabuğu görünümü ile karakterize topoğrafik bir değişimdir (Rossi ve Vergnanini,

2000). Selülit genel olarak hastalık olarak değerlendirilmemektedir. Sadece derinin tekdüze görünümünü bozan kozmetik bir sorundur.

20 yaş üstü kadınların yaklaşık olarak %85'inde farklı evrelerde selülit olduğu varsayılmaktadır (Rawlings, 2006). Ergenlikte başlayıp hayat boyu artarak devam eder. Bu durumu Goldman (2002) ergenlik sonrası dönemde kadınların gebelik ve emzirme dönemlerinde ihtiyaç duyulacak fazladan kalori ihtiyacının karşılanmasına hazırlık amacıyla, özellikle östrojen hormonu etkisiyle adipoz dokularda yağ biriktirmesinden kaynaklandığını açıklamıştır (Goldman, 2002). Selülitin çoğunlukla kadınlarda görülmesinin en önemli nedeni de kadınlarda salınan östrojenin lipojenez yani yağ molekülü sentezini uyarırken, lipoliz yani yağ yıkımını engellemesidir (Hexsel ve ark., 2010).

Selülit gelişiminde genetik yatkınlıkla beraber cinsiyet, etnik köken, yaşam tarzı ve çevresel faktörler de önemli rol oynamaktadır.

### **1.6.1. Selülit Oluşumu ve Evreleri**

Selülit epidermis, dermis ve deri altı dokuyu içeren pek çok karmaşık hadisenin sonucunda meydana gelir. Selülitin fizyolojik oluşumunun temel nedenleri; bağ dokusunun anormal hiperpolimerizasyonu, yağ dokusundaki başlıca değişimler ve mikro dolaşımdaki değişimler olarak özetlenebilir (Rossi ve Vergnanini, 2000).

Hipodermis derisinin el alttaki katmanı olup, fibröz şeritler ile birbirinden ayrılan yağ globüllerinin içine konumlanmış yağ hücrelerinden oluşmaktadır. Yağ hücreleri arasında da kapiler ve lenf damarları bulunur (Rawlings, 2006).

Kadın ve erkek deri altı yapıları birbirinden farklılıklar göstermektedir. Bu farklılardan en önemlisi hipodermis tabakasında bulunan fibröz şeritlerin kadınlarda dermise dikey konumlanırken erkeklerde dermise açı yapmasıdır. Bunun sonucunda

kadınlarda yağ hücrelerinin büyümesiyle, yağ globülleri fibröz iplikçikler arasında sıkışır ve yukarı yani dermise doğru genişlemeye ve dokuyu girintili çıkıntılı hale getirmeye başlar. Erkeklerde ise fibröz iplikçikler genişlemeyi yanlara ve alta doğru yönlendirir. Bunun sonucunda erkeklerdeki kilo alımı derinin üst tabakalarında selülit oluşturmazken kadınlarda dermise doğru ilerleyen yağ globülleri selülit meydana getirir (Nurnberger ve Muller, 1978).

Selülitin üçüncü veya dördüncü evrelerinde dermiste bulunan ter bezleri de dermis tabakasına ilerleyerek yağ globülleri arasında sıkışabilmektedir. Hipodermiste meydana gelen bu süreç sonucunda; doku içinde kapiler ve lenf dolaşımı baskılanır, sıvı retansiyonu bozulmaya başlar, mikro dolaşım yavaşlar, damar ve lenflerden doku içine sızan sıvılar ödem oluşumuna neden olur (Franchi ve ark., 2003). Özet olarak selülit, derinin hipodermis tabakasında bulunan yağ hücrelerinin kilo alımıyla büyümesi ve deri esnekliğinin farklı sebeplerle azalması sonucu gözlenen bir değişimdir.

Selülit, histopatolojik ve klinik özelliklerine göre dört evrede incelenebilir (Rossi ve Vergnanini, 2000; Smith, 1995).

#### Evre 1

Birinci evre selülit olan kişide semptomlar henüz oluşmamıştır. Kozmetik açıdan derinin görüntüsünde bir değişiklik olmadığı için kişide rahatsızlık yaratmaz. Ancak hücresel ve moleküler değişiklikler mevcuttur ve bunlar derinin alt tabakalarının ileri tetkikleri ile saptanabilir.

#### Evre 2

İkinci evre selülitte dermis ve hipodermiste bozunmalar belirginleşmiştir. Kişide selülit varlığı bölgeye dışardan bir basınç uygulanması veya bu bölgedeki kasların kişi tarafından kasılması sonucunda deride meydana gelen solukluk, sıcaklık azalması ve elastikiyet kaybı gibi etkilerle gözlenebilir. Bunun dışında fiziksel bir baskı olmadığında çukurluklar gözlenmez. Selülit oluşumunun başladığı bölgelerdeki kan

damarlarında farklılaşmalar, mikrosirkülasyonun bazı bölgelerde azalmalar ve hipodermis tabakasında yağ hücrelerinde topaklaşmalar başlamıştır.

### Evre 3

Bu evrede selülit olan bölgeye dışardan bir basınç uygulamasına gerek kalmadan tipik portakal kabuğu görünümü oluşur.

Dermis tabakasındaki vasküler bozunmalar oluşur, deriye esnekliğini veren protein sentezi ve onarımı yavaşlar, yağ depolarının etrafını retikülerproteinik yapılar sarar ve bunların sonucunda bölgenin dışardan sıkıştırılmasıyla derin çukurluklar net bir biçimde gözlemlenir.

### Evre 4

Son evrede üçüncü evre ile benzer özellikler gözlenmesiyle birlikte, klinik olarak daha bariz, gözle görülür ve ağrılı nodüller, dermis ve altı tabakalarda yapışıklıklar ve deri yüzeyinin tam anlamıyla dalgalı bir görünüme bürünmesi gözlenir.

Selülit başlıca, yağ dokusundaki değişiklikler, mikrodolaşımın bozulması ve bağ dokusunun zayıflamasına bağlı olarak oluşur. Selülitin bakımında güncel olarak uygulanan yöntemler; selülit oluşumunu tetikleyici faktörlerin ortadan kaldırılması, fiziksel, kimyasal ve termal yöntemler ile farmakolojik tedaviler olarak üç kategoride incelenebilir. Pek çok kozmesötik aktif bileşik günümüzde selülitin giderilmesinde kullanılmakta olup, her geçen gün yeni ve etkili uygulama seçenekleri oluşturulmaya devam etmektedir.

## **1.6.2. Selülit Belirtilerini Azaltıcı veya Giderici Uygulamalar**

Selülit azaltmak ve gidermek amacıyla uygulanan çeşitli yaklaşımlar mevcuttur. Bunlar temel olarak; selülit oluşumunu tetikleyici faktörlerin azaltılması, fiziksel ve

mekanik metodlar ve topikal uygulamalar olarak üç gruba ayrılabilir. Ancak erken evrelerde girişim ve uygulamaların başarısının çok daha yüksek olduğu unutulmamalıdır.

Günümüzde selülitin kozmetik bakımında kullanılan uygulamaların çoğunda etkiler kısmi veya geçicidir. Yeni yaklaşımlarda dahi selülitin karmaşık doğasını anlamadan iyileşme amaçlanmakta fakat etkisiz yöntemler geliştirilebilmektedir. Başarılı bir bakım ancak selülitin yerleşmiş olduğu deri altı yağ dokusunun hedef alınmasıyla elde edilebilir.

### **1.6.3. Topikal Tedavi Hedefleri**

Lipoliz terimi yağların parçalanması ve vücuttan atılması olarak tanımlanır ve selülit tedavilerinde gerçekleştirilmek istenen bir durumdur. Lipojenez ise en basit anlatımla, hücrelerin yağ üretimini arttırması olarak tanımlanmaktadır. Dolayısıyla, selülit tedavisinde, lipolizin uyarılıp lipojenezin baskılanması ana hedefdir (Tırnaksız, 2006).

Hücre yağ hacmi, lipidlerin hücre yüzeylerinde bulunan alfa2 ve beta adrenerjik reseptörleri tarafından kontrol edilmektedir. Lipoliz olay, beta adrenerjik reseptör stimülasyonu ile oluşurken, lipojenez ise alfa2 adrenerjik reseptörün aktive edilmesi ile meydana gelmektedir. Selülitin etkin bakımı amaçlanıyorsa, beta reseptörlerinin stimülasyonunu yanında alfa2 reseptörlerinin inhibisyonu da sağlanmaya çalışılmalıdır. Selülitin kozmetik bakımında tek başına beta reseptörlerin uyarılması, alfa2 reseptörler inhibe edilmedikçe çok fazla fayda sağlamamaktır. İkisinin bir arada başarılı olduğu durumda, lipoliz sonucu ortaya çıkan yağ asitlerinin hücre içinde lipid sentezinde kullanılması bloke edilmekte ve hücre dışına atılımı sağlanmaktadır (Di Salvo, 1995).

Yağ hücresinde beta reseptörünün stimüle edilmesi ile ATP'nin cAMP'ye dönüşümünü sağlayan adenilat siklaz enzimi aktive olur. Bunun sonucunda; cAMP'nin hücre içindeki miktarının artması ile hücre içinde bulunan trigliserit lipaz enzimi aktif duruma dönüşür. Trigliserit lipaz enzimi, lipolizi yani yağın parçalanmasını sağlar. Diğer yandan alfa2 reseptörünün inhibe edilmesiyle, yağ hücresi içindeki cAMP, fosfodiesteraz enzimi ile 5'AMP'ye dönüşür. Fosfodiesteraz enziminin baskılanması, hücre içinde cAMP miktarının artmasına dolayısıyla hücre içindeki yağ yıkımının artmasını sağlar (Curri, 1993).

#### **1.6.4. Topikal Tedavide Kullanılan Ajanlar**

Topikal antiselülit preparatları etki mekanizması yönünden incelendiğinde dört ana grupta toplanır. Bunlar:

- 1- Mikrosirkülasyonu arttıranlar,
- 2- Lipojenezi azaltıp lipolizi arttıranlar,
- 3- Dermisin ve subkutanöz dokunun yapısını eski haline getirenler,
- 4- Serbest radikal oluşumunu engelleyen veya serbest radikaller yakalayanlar (Hexsel ve ark., 2010).

Tezde, lipojenezi azaltıp lipolizi arttırarak etkiyen metil ksantinler aktif kozmesötik madde grubu olarak seçilmiştir. Bu gruba örnek olarak ürünlerde sıklıkla yer alan kafein, aminofillin, teofillin ve teobramin verilebilir. Çalışmamızda model aktif madde olarak kafein seçilmiştir.

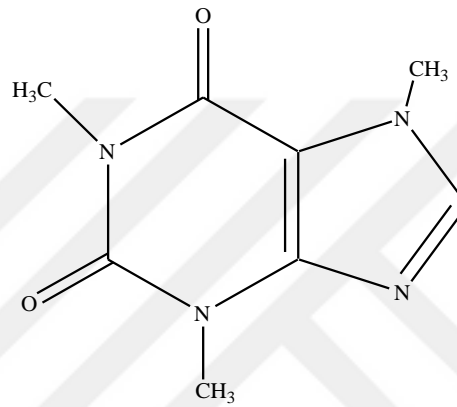
#### **1.7. Kafein**

Günümüzde ksantinler selülitin kozmetik bakımında en çok tercih edilen kozmesötik aktif bileşiklerdendir. Söz konusu etkin maddeler beta reseptörlerini uyarıcı, alfa2 reseptörlerini baskılayıcı, aynı zamanda fosfodiesteraz enzimini de etkili bir şekilde inhibe edici özelliklere sahiptir.

Kafein ksantin türevi bir doğal alkaloiddir. Kahve çekirdekleri, çayın elde edildiği bitki olan Camellia sinensis yaprakları, maté yaprakları, guarana bitkisi tohumlarından doğal olarak elde edilebilir.

Kapalı Formülü:  $C_8H_{10}N_4O_2$

Açık Formülü:



Şekil 1.7. Kafein açık formülü

Molekül Ağırlığı: 194,19 g

Kimyasal Yapısı: 3,7-Dihidro-1,3,7-trimetil-1H-pürin-2,6-dione

### 1.7.1. Fizikokimyasal Özellikleri

**Renk, Görünüş:** Beyaz mat kristal tozdur.

**Çözünürlük:** Suda 1/60 oranında, kaynar suda 1/1 oranında, etanolde 1/130 oranında ve kloroformda 1/7 oranında çözünür. Eterde önemsiz miktarda çözünür.

**Erime Derecesi:** Kafeinin erime noktası 234-239°C arasındadır.



**UV Spektrumu:** Asidik çözeltileri 273 nm’de maksimum absorbands verir (S. S. Brown, 1986).

### **1.7.2. Farmakolojik Özellikleri**

Kafein beyinde adenozin A1 ve A2 reseptörleri üzerinde antagonistik etki oluşturur. Adenozin ve kafein benzer kimyasal yapıya sahiptir ve asetilkolin, serotonin, dopamin, nöradrenalin, gamaaminobutirikasit gibi nörotransmitterlerin salımını etkiler. Böylece merkezi sinir sisteminde stimulan etki oluşturarak uyanıklığı ve mental aktiviteyi artırır. Ayrıca fosfodiesteraz enzim inhibisyonu ile kan basıncını arttırdığı rapor edilmiştir (Fisone ve ark., 2004).

### **1.7.3. Kafeinin Topikal Kullanımı**

Kafein topikal olarak pek çok farklı kozmetik ve farmasötik ürün bileşimine girmiştir. Dermal risk değerlendirmesi deneylerinde model hidrofilik bileşik olarak da kullanılmaktadır (OECD, 2004). Hidrofilik bileşiklerin deri üzerindeki yağ tabakası ve epidermal bariyerin engelleyici etkisinden dolayı stratum corneumdan penetrasyonu zordur. Topikal uygulamadaki bu kısıtlamanın üstesinden gelmek amacıyla kafeinle pek çok araştırma yapılmıştır.

Yapılan bir çalışmada kafein yüklenen SLN hidrojel ve kafein hidrojel formülasyonları hazırlanmış. Canlı sıçanlara iki formülasyon 21 gün süreyle uygulanmış ve sıçanların kafein SLN hidrojel uygulanan bölgesi ve kafein hidrojel uygulanan bölgesi arasında hipodermiste bulunan yağ tabakası miktarındaki azalma ve adipositlerde oluşan lizis oranı kıyaslanmıştır. Kafein SLN hidrojel uygulanan bölgelerde kafein hidrojel uygulanan bölgelere kıyasla yağ dokusu miktarı önemli düzeyde azaldığı ve adiposit lizisinin de yüksek olduğu gösterilmiştir (Hamishehkar ve ark., 2014).

Kafein, kozmetiklerde cilt altında aşırı yağ birikimini önlemesi, lenfatik drenajı arttırması ve deriyi ışık hasarından koruması iddiasıyla kullanılmaktadır. Kafeinin, dehidrasyon etkisi ve yağ hücreleri üzerindeki lipolitik aktivitesi nedeniyle, deri üzerine topikal olarak uygulandığında ciltte selülit görünümünü düzelttiği iddia edilmektedir (Velasco ve ark., 2008).

Kafein UV ışınlarına karşı koruyucu ve cilt hücrelerinde serbest radikal oluşumunu azaltıcı etkileriyle güneşten koruyucu, yaşlanma karşıtı ve kırışıklık giderici preparatların içeriğine eklenmektedir. Bu etkisiyle UV kaynaklı cilt kanserlerinin önlenmesinde de yararlı olabileceği değerlendirilmektedir (Conney ve ark., 2013; Lu ve ark., 2001).

Saç preparatlarında, 5- $\alpha$ -redüktaz enzimi üzerinde oluşturduğu inhibisyon ile saç dökülmesini engelleyici, yavaşlatıcı ve yeni saç oluşumuna arttırıcı etkilerinden dolayı kullanılmaktadır (Fischer ve ark., 2007).

#### **1.7.4. Kafeinin Selülitte Kullanımı**

Kafeinin topikal kullanımıyla ilgili literatürdeki çoğu çalışma hücre kültürü veya fare modellerine dayanmaktadır ve önerilen etkilerin çoğu bilimsel olarak tam anlamıyla kanıtlanmamıştır (Herman ve Herman, 2013).

Kafein, selülit oluşumuna neden olan kompleks hücre içi sinyal yollarını çeşitli şekillerde etkileyen bir moleküldür. Selülitin giderilmesine dört şekilde etki ettiği düşünülmektedir. Bunlar:

1. Katekolamin sekresyonuna etki ederek adrenerjik reseptörleri uyarır. Bu uyarı hücrelerdeki cAMP düzeylerini arttırarak lipoliz sürecinde lipaz düzeyini yükseltir (Diepvens ve ark., 2007).

2. Adrenerjik reseptörleri bloke eder, fazla miktardaki yağın birikimini engelleyerek lipoliz sürecini hızlandırır (Dodd ve ark., 1993; Panchal ve ark., 2012).
3. Fosfodiesteraz (PDE) enzim aktivitesinin inhibisyonu yoluyla ve adipositlerdeki cAMP seviyelerini artırarak lipolizi uyarır (Vogelgesang ve ark., 2011).
4. Yağ dokusunda lenf drenajını uyararak lipoliz işlemi sırasında ortaya çıkan ve mikrosirkülasyonu engelleyebilecek olan birikmiş yağ ve toksin gibi gereksiz maddeleri ortamdan uzaklaştırarak da selülitin oluşumunun engellenmesini kolaylaştırır (Pires-de-Campos ve ark., 2008)

Bir grup araştırmacı 2008 yılında yaptıkları çalışmada domuz hipodermisinde ultrasonda kullanılan jelin etkinliğini incelemişlerdir (Pires-de-Campos ve ark., 2008). Etkiyi kıyaslamak amacıyla jeli tek başına, aynı jeli ultrasonla, %5 kafeinle hazırladıkları jeli tek başına ve %5 kafeinle hazırladıkları jeli ultrasonla 15 gün günde bir defa olmak üzere ayrı bölgelere uygulamışlar. Beşinci bir bölgeyi de kontrol amacıyla hiçbir topikal uygulama yapmadan gözlemlemişler. Tüm beş grup içinde sadece kafeinli jelle birlikte ultrason uygulama yapılan bölgede anlamlı bir değişim olduğunu saptanmışlar. Sonuçlar, kafein jelin ultrasonla uygulandığı bölgedeki subkutanöz adipoz doku kalınlığında önemli bir azalmayla birlikte yağ hücrelerinin sayısında da azalma olduğunu göstermiştir (Pires-de-Campos ve ark., 2008).

Bu tezin temel amacı selülitin kozmetik bakımı için kafein içeren nano yapılı lipid taşıyıcı sistemlerin tasarımıyla kalite - QbD yaklaşımı ile geliştirilmesi ve uygun bir formülasyonun oluşturulmasıdır. QbD temelli formülasyon optimizasyonu için yapay zeka araçları kullanılmış ve optimum yarı katı NLC formülasyonuna ulaşılmıştır.

## 2. GEREÇ ve YÖNTEM

### 2.1. Kullanılan Cihaz ve Kimyasal Malzemeler

#### 2.1.1. Kullanılan Cihazlar

UV Spektrofotometre	: Shimadzu UV-1601, Japonya
Ultraturaks	: IKA T25 Basic
Yüksek Basınçlı Homojenizatör	: Microfluidics M110L
Ultrasonikatör	: Bandelin Sonopuls HD 2070, Almanya
Ultrasonikatör	: Sonics Vibra Cell VC 505, Almanya
pH Metre	: Mettler Toledo S-20K, İsviçre
Manyetik Karıştırıcı	: Wisestir SMHS3 Daihan Scientific, Kore
Manyetik Karıştırıcı	: Stuart SB 162-3, İngiltere
Ultrasantrifüj	: Sigma 3-30KS, Almanya
Viskozimetre	: Brookfield DV-II, ABD
Hassas Terazî	: Sartorius BL 210S, Almanya
Partikül Büyüklüğü Tayin Cihazı	: Malvern Inst. Ltd., ZetaSizer NanoZS, UK
Geçirimli Elektron Mikroskopu	: FEI Tecnai Spirit, Japonya
Diferansiyel Tarama Kalorimetresi	: Shimadzu DSC-60, Japonya
Diyaliz Membran	: Sigma-Aldrich, Almanya, MWCO: 12- 14kDa
TA-XT Plus Tekstür Analiz Cihazı	: Stable Micro Systems, UK

## 2.1.2. Kimyasal Malzemeler

Kafein	: Deva /Türkiye
Metanol	: Merck, Almanya
Disodyum Hidrojen Fosfat	: Merck, Almanya
Potasyum Dihidrojen Fosfat	: Carlo Erba, Almanya
Sodyum Hidroksit	: Riedel de Haen, Almanya
Sodyum Klorür	: Molychem
Tripalmitin	: Sigma Aldrich; ABD
Tristearin	: Sigma Aldrich; ABD
Compritol 888 ATO	: Gattefosse, Fransa
Precirol ATO 5	: Gattefosse, Fransa
Stearik Asit	: Sigma Aldrich; ABD
Argan Yağı	: Mecitefendi, Türkiye
Poloxamer 407	: Ulkar, Türkiye
Poloxamer 188	: Sigma, Almanya
Tween 80	: Fluka, İngiltere
Biomix ECO	: Sharon Laboratories, İsrail

## 2.2. Kafein ile Yapılan Çalışmalar

### 2.2.1. Kafeinin Ultraviyole (UV) Spektrumunun Belirlenmesi

Kafeinin metonolde ve pH 7,4 PBS tamponunda (B.P) 10µg/ml konsantrasyondaki çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin 190nm-400nm aralığında UV spektrumu alındı ve maksimum absorbans ( $\lambda_{max}$ ) gösterdiği dalga boyları belirlenmiştir.

pH 7,4 PBS tamponu hazırlanmıştır. İçeriği ve hazırlanışı aşağıda verilmiştir. (British Pharmacopea, 1988).

Disodyum hidrojen fosfat	2,38 g
Potasyum dihidrojen fosfat	0,19g
Sodyum klorür	8g
Distile su	ym 1000 ml

pH 7,4 fosfat tamponu hazırlamak için, 1000 ml'lik balonjojeye disodyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojen fosfat ve sodyum klorür belirtilen miktarda tartılarak konulmuş ve üzeri distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

### 2.2.2. Kafeinin Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC) Analizi

Saf haldeki kafeinin diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) analizi yapılarak termal davranışı incelenmiştir. Bunun için yaklaşık 3 mg ağırlığındaki aktif bileşik alüminyum pan içine konmuş, hermetik olarak kapatılarak cihaza yerleştirilmiştir. Hazırlanan örnek 25-350 C° aralığında ve 40 mL/dakika azot gazı akımı altında 5°C/dakika hızla ısıtılmış ve aktif bileşiğin DSC termogramı alınmıştır.

### **2.2.3. Kafeinin Kalibrasyon Doğrularının Belirlenmesi**

#### **2.2.3.1. Kafeinin Metanol İçindeki Kalibrasyon Doğrusunun Belirlenmesi**

Kafeinin metanolde 100 µg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiler kullanılarak her biri için ayrı olmak üzere mililitrede 2 ile 18 mikrogram arasında olacak şekilde 9 farklı seyreltmesi yapılmıştır. Çözeltiler Shimadzu UV-1601 spektrofotometre kullanarak, 273 nm'de analiz edilmiştir. Belirlenen konsantrasyonlardaki çözeltilerin absorbens değerleri kullanılarak doğru denklemi hesaplanmıştır. Üç tekrar yapılan deneyin sonuçlarının ortalaması alınmıştır (n=9).

#### **2.2.3.2. Kafeinin pH 7,4 PBS Çözeltisi İçindeki Kalibrasyon Doğrusunun Belirlenmesi**

Kafeinin pH 7,4 PBS tamponunda 100 µg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiler kullanılarak her biri için ayrı olmak üzere mililitrede 2 ile 18 mikrogram arasında olacak şekilde 9 farklı seyreltmesi yapıldı. Çözeltiler Shimadzu UV-1601 spektrofotometre kullanarak, 273 nm'de analiz edildi. Belirlenen konsantrasyonlardaki çözeltilerin absorbens değerleri kullanılarak doğru denklemi hesaplandı. Üç tekrar yapılan deneyin sonuçlarının ortalaması alındı (n=9).

### **2.2.4. Kafeinin Miktar Tayini Yönteminin Analitik Validasyonu**

Validasyon; herhangi bir yöntemde işlem, araç ve gereç, materyal, sistem ve faaliyetlerin beklenen sonuçları verdiğinin kanıtlanması işlemidir.

Aktif bileşik için geliştirilen miktar tayini yönteminin, belirlenen koşullara doğru ve kesin bir şekilde sürekli olarak bekleneni gerçekleştirdiğinin kanıtlanması için validasyon işlemleri gerçekleştirilmelidir.

Kafeinin miktar tayininin validasyon çalışmaları metanol ortamında ICH Q2(R1) (Guideline, 2005) klavuzuna uygun olarak yapılmış ve aşağıda açıklanan validasyon parametreleri kullanılmıştır. Aynı validasyon çalışmaları pH 7,4 PBS ortamında da yapılmıştır.

#### **2.2.4.1. Doğrusallık ve Aralığı**

Analit cevabının, konsantrasyona karşı doğru orantılı olması ve analite özgü konsantrasyon aralığında çizilen grafikte yanıt noktalarının düz bir çizgi üzerinde yer alması, doğrusallık olarak tanımlanmaktadır. Analitik prosedürün uygun bir doğruluk, doğrusallık ve kesinlik seviyesinde sahip olduğu kanıtlanmış olan numunedeki analitin üst ve alt konsantrasyonu arasındaki aralık ise analitik prosedürün aralığıdır.

Kafeinin tayini yönteminin doğrusallığının gösterilmesi için 2 – 18 µg/ml aralığında çözeltileri hazırlandı. UV absorpsanları daha önce okunan  $\lambda_{max}$  dalga boyunda ölçüldü. Elde edilen absorpsan verilerine karşılık gelen konsantrasyon değerleri yardımıyla “GraphPad-Prism8” istatistiksel olarak elde edilen doğru için %95 olasılıklı güven sınırları belirlenmiştir.

#### **2.2.4.2. Doğruluk ve Geri Elde**

Analizlerle elde edilen sonuçların referans kabul edilmiş değerlere olan yakınlığına analitik yöntemin doğruluğu denir.



Kafeinin 50 µg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisi kullanılarak, 4µg/ml, 10µg/ml, 16µg/ml konsantrasyondaki üç farklı çözeltisi hazırlandı. Çözeltilerin absorbans değerleri UV spektrofotometre kullanılarak 6'şar kere ölçülmüş ve ölçümlere karşılık gelen konsantrasyonlar bulunmuştur. Konsantrasyonlar yardımıyla % geri elde değerleri, standart sapma ve %bağıl standart hesaplanarak miktar tayini yönteminin her iki ortam için de doğruluğu incelenmiştir.

#### **2.2.4.3. Kesinlik**

Geliştirilen yöntem için öngörülen koşullar altında aynı örneğin çoklu örneklemesinden elde edilen bir dizi ölçüm arasındaki uyumun yakınlığını ifade eder. Başka bir tanımla numuneden aynı yöntem ile birbirini takip eden ölçümlerle elde edilen sonuçlar arasındaki yakınlık derecesidir. Tekrarlanabilirlik (tekrar edilebilirlik) ve ara kesinlik ile ifade edilir ve hesaplanır.

##### **2.2.4.3.1. Tekrarlanabilirlik (Tekrar Edilebilirlik)**

Tekrarlanabilirlik, yöntemin kısa bir zaman aralığı içinde ve aynı koşullar altında elde edilen kesinliğini ifade eder.

Tekrarlanabilirlik için, 10 µg/mL derişimde hazırlanan kafein örneğine ait absorbans değerleri art arda altı kez ölçüldü. Absorbansa karşılık gelen derişimlerin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

##### **2.2.4.3.2. Ara Kesinlik**

Ara kesinlik farklı günlerde, farklı cihazlarla veya farklı analizcilerin ölçümleri sonucu saptanan değerlerle çalışmanın kesinliğini belirleyen parametredir.

Kafeinin miktar tayini yönteminin ara kesinliğinin saptanabilmesi için; 50 µg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisi kullanılarak 4µg/ml, 10µg/ml, 16µg/ml konsantrasyonlarda üç farklı örnek hazırlanmıştır. Bu örneklerin UV ile absorbansları iki farklı analizci tarafından ölçülmüştür. Bu absorbanslara karşılık gelen pratik konsantrasyonlar bulunmuştur. Seçilen üç teorik konsantrasyonda, iki analistin yaptığı ölçümler sonucunda hesaplanan ortalama pratik konsantrasyon değerleri arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenmesi için veriler “IBM SPSS® Statistics” programı yardımı ile %95 güven aralığı içinde birbirleriyle karşılaştırılarak bağımlı örneklem T testi (Paired-Sample T Test) uygulanmıştır.

#### 2.2.4.4. Teşhis ve Tayin Sınırları (LOD, LOQ)

Teşhis sınırı, analizi yapılan örneğin teşhis edilebildiği fakat nicel sınırlar içerisine girmediği en düşük miktardır.(LOD) Tayin sınırı, analizi yapılan maddenin uygun kesinlik ve doğrulukla miktarının tayin edilebileceği ve kalibrasyon doğrusunun en alt derişimini oluşturan veya onun da altında olabilen derişim düzeyidir (LOQ).

Teşhis sınırı (TS) ve Tayin sınırı (TAS) aşağıda verilen Denklem 2.1. ve Denklem 2.2.’ye göre hesaplanmıştır.

$$TS(LOD) = \frac{3,3 \times \sigma}{m} \quad (\text{Denklem 2.1})$$

Bu eşitliklerde

$\sigma$  : Cevabın standart sapması

$$TAS(LOQ) = \frac{10 \times \sigma}{m} \quad (\text{Denklem 2.2});$$

$m$ : Kalibrasyon doğrusunun eğimi

#### 2.2.4.5. Özgünlük

Bir analitik yöntemin özgünlüğü, etkin maddenin analizi yapılacak numunede var olan diğer maddelerden ayrı bir şekilde ölçülebilmesidir.

Özgünlüğün belirlenmesi için kafein içermeyen lipid nanopartiküllerin belli konsantrasyonlarda dispersiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan dispersiyon 26.000 rpm hızda 15 dakika santrifüj edildi ve 0,22µm'lik filtrelerden geçirilerek 273nm'de UV'de absorbans değerlerine bakılmıştır. Böylece lipid nanopartikül oluşturulmasında kullanılan yardımcı maddelerin kafein ile girişim yapıp yapmadıkları incelenmiştir.

#### **2.2.4.6. Kafeinin Kısa Süreli Stabilite Tayini**

Aktif bileşiğin kullanılan ortamlardaki dayanıklılığı hakkında bilgi edinmek amacıyla yapılmaktadır. Kısa süreli stabilite çalışmaları için kafeinin metanolde ve pH 7,4 PBS tamponunda, 50 µg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisinden yararlanılarak 10 µg/ml konsantrasyondaki çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti 37C° sıcaklıkta 48 saat boyunca bekletilmiştir. 0. 24. ve 48. saatlerde numuneler alınarak UV analizleri yapılmıştır. (n=3).

### **2.3. Farmasötik Gelişim ve Tasarımla Kalite Çalışmaları**

Farmasötik gelişimin asıl hedefi, ürünün amaçlanan performansını tutarlı bir şekilde elde edilmesi için kaliteli bir ürün ve üretim süreci tasarlamaktır. Farmasötik geliştirme çalışmaları ve üretim deneyiminden edinilen bilgiler, tasarım alanı, spesifikasyonlar ve üretim kontrollerinin kurulmasını desteklemek için bilimsel bir anlayış sağlar. Tasarımla kalite çalışmaları, sistemik bir farmasötik gelişim yaklaşımıdır. Önceden tanımlanmış ürün kalitesinin, etkinliğinin ve güvenilirliğinin garantiye alınması için formülasyonlar ve üretim işlemleri tasarlanması, geliştirilmesi olarak özetlenebilir. Her durumda farmasötik ürün hastanın ihtiyaçlarını ve amaçlanan ürün performansını karşılayacak şekilde tasarlanmalıdır.

QbD basamakları kapsamında geliştirmeyi amaçladığımız yarı katı lipid nanopartiküller üzerinde uygulanan tasarımla kalite adımları aşağıda başlıklar halinde anlatılmıştır.

**1. Bilgi alanının oluşturulması:** Selülitin kozmetik bakımında kullanılacak olan yarı katı lipid nanopartikül formülasyonunu geliştirebilmek için QBD kapsamındaki ilk adım bilgi alanının oluşturulmasıdır. Bu amaçla öncelikle literatür incelenmiş, aktif bileşen ve yardımcı maddeler; üretim prosesleri hakkında var olan bilgiler toplanmıştır. Ön formülasyon çalışmaları yapılmış ve burada elde edilen tüm bilgiler bilgi alanına eklenmiştir.

**2. Hedef ürünün kalite profilinin belirlenmesi:** Selülit kadınların %85-90 kadarında görülen estetik bir problemdir. Bu estetik bozukluğun bakımında kullanılmak üzere geliştirilen konvansiyonel piyasa preparatları selülitin karmaşık patofizyolojisini tam olarak anlamadan geliştirilmiştir. Özellikle kadınlarda estetik kaygılar oluşturan deri anatomisinde gelişen bu değişikliğin bakımında konvansiyonel kremlere alternatif olabilecek ve derinin alt katmanlarına ulaşabilecek nitelikte bir yarı katı lipid nanopartiküler sistem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Böylece derinin alt katmanlarına ulaşabilecek nano boyutta ve deriden geçişe uygun lipid özellikli bir sistem geliştirilerek selülitin bakımının daha etkili bir şekilde yapılması hedeflenmiştir. Aynı zamanda selülitin bakımında, iyileşmeye katkı sağlayacak okluzif özelliği artırılmış topical kullanıma uygun pH ve viskozluğa sahip yarı katı lipid nanopartikül formülasyonu hedef ürün kalite profilini oluşturmaktadır. Final yarı katı lipid nanopartikül formülasyonuna ait hedef ürün kalite profili Çizelge 2.1’de verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Yarı katı lipid nanopartiküllere ait hedef ürün kalite profili

<b>QTPP</b>	<b>Hedef</b>
<b>Uygulama yolu</b>	Dermal
<b>Uygulama için alternatif yöntem</b>	Yok
<b>Taşıyıcı sistem</b>	Yarı katı lipid nanopartikül
<b>Doz rejimi</b>	%2 a/a aktif bileşik içeren sistem
<b>Kozmesötik etki</b>	Selülinin kozmetik bakımı ve iyileştirilmesi
<b>Viskozite</b>	Geniş uygulama alanlarına yayılabilecek uygun viskozlukta
<b>pH</b>	Deri pH'sı ile uyumlu
<b>Salım profili</b>	Kontrollü aktif bileşik salımı
<b>Oklüzif etki</b>	Derinin hidrasyonunu sağlayacak en yüksek oklüzif etki
<b>Stabilite</b>	Oda sıcaklığında görünür bir faz ayrışması işareti olmayan ve stabilitesini oda sıcaklığında bir ay boyunca koruyan ürün

**3. Kritik kalite özelliklerinin belirlenmesi:** İdeal dozaj formunun temelini oluşturan QTPP'ye ulaşabilmek için öncelikle ürün performansını etkileyen ve kritik olarak değerlendirilen kalite özellikleri belirlenmelidir. Çalışmamızda belirlediğimiz QTPP'ye ulaşabilmek için yarı katı lipid nanopartiküllerin; partikül boyutu, polidispersite indeksi ve oklüzyon faktörü değerleri kritik kalite özellikleri olarak belirlenmiştir. Söz konusu kritik kalite özellikleri Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

**Çizelge 2.2.** Kalite Özellikleri ve Kafein İçeren Yarıkatı Lipid Nanopartiküllerin Kritik Kalite Özellikleri

<b>Kalite Özellikleri</b>	<b>Hedef</b>	
<b>Organoleptik özellikler</b>	Beyaz, kokusuz dispersiyon	Kritik değil
<b>Partikül boyutu</b>	150 – 250 nm aralığında olmalı	*Kritik
<b>Polidispersite indeksi</b>	0,3'ten küçük olmalı	*Kritik
<b>Zeta Potansiyeli</b>	-30 mV – 0mV aralığında olmalı	Kritik değil
<b>Oklüzyon faktörü</b>	%20'nin üstünde olmalı	*Kritik
<b>İşlem etkinliği</b>	Minimum %95	Kritik değil
<b>pH ve Viskozite</b>	Deri pH'sı ile uyumlu, geniş yüzey alanına uygulanabilir Viskozlukta	Kritik değil

**4. Kritik proses parametreleri ve kritik materyal özelliklerinin belirlenmesi:** İşlemin değişkenleri olarak tanımlanan parametre, QbD

kapsamındaki çalışmamızda hem üretim yönteminin hem de girdi materyallerinin özelliklerini ifade etmektedir. Kritik proses parametresi (CPP) hedeflenen QTPP'ye ulaşabilmek için yani istenilen ürün kalitesinin elde edilebilmesi için kontrol edilmesi gereken üretim yöntemine ait değişkenler iken kritik materyal özellikleri (CMA) ise formülasyon bileşenlerine ait değişkenlerdir. Hedef ürün kalite profiline ulaşabilmek için Bölüm 1.4.6'de anlatılan lipid nanopartikül üretim yöntemleri bilgi alanı içerisinde incelenmiş ve ön formülasyon çalışmaları yapılarak hem işleme hem de formülasyona ait kritik parametreler belirlenmiştir.

**5. Kontrol stratejisi:** Bu aşamada materyallerden veya prosesten kaynaklı değişkenliğin kontrol edilebilmesi ve tanımlanmış hedef ürün kalite profiline ulaşabilmek için kontrol edilmesi gereken kritik kalite özellikleri için kontrol stratejisi geliştirmiştir.

**6. Veri Analizi:** Bu aşamada girdi materyali, formülasyon parametresi, işlem değişkenleri ve bitmiş ürün özelliklerinin değerlendirilmesinde ve bu değişkenlerin QTPP ile ilişkilendirilmesinde veri analizi teknikleri kullanılmıştır. QbD çalışmamız kapsamında yapay zeka araçları yardımıyla formülasyon optimizasyonu yapılmıştır.

### **2.3.1. Ön Formülasyon Çalışmaları**

QbD adımları doğrultusunda öncelikle yarı katı katı lipid nanopartiküllerin (SLN) ve nano lipid taşıyıcıların (NLC) oluşturulmasına yönelik farklı hazırlama yöntemleri üzerinde çalışılmıştır. Ön formülasyon çalışmaları sonunda uygun üretim yöntemi seçilerek proses parametreleri ve materyal özellikleri incelenmiştir.

### **2.3.1.1. Yüksek Basıncılı Homojenizasyon Yöntemiyle Yarı Katı Lipid Nanopartiküllerin Hazırlanması için Gerçekleştirilen Ön Çalışmalar**

Ön formülasyon çalışmalarında ilk üretim yöntemi olarak seçilen yüksek basınçlı homojenizasyon (YBH) yönteminde yarı katı lipid nanopartikülleri oluşturmak amacıyla kullandığımız yüksek basınçlı homojenizatörün (Microfluidics M110L) basınç değeri 650 barda sabit tutulmuş ve döngü sayısı da 5 olarak belirlenmiştir.

Bu yöntemle yapılan ön formülasyon çalışmalarında farklı özelliklerdeki lipidler denenmiştir. Trigliserit yapısındaki nötral lipidlerden tripalmitin (Dynasan 116), tristearin (Dynasan 118); gliseritlerin karışımlarından oluşan gliseril behenat (Compritol 888 ATO) ve gliseril palmiostearat (Precirol ATO 5) ve doymuş yağ asitleri grubundan da stearik asit kullanılarak ilk formülasyonlar hazırlanmıştır.

Lipid nanopartiküllerin oluşturulmasında farklı yüzey aktif maddeler (YAM) de denenmiştir. Ön formülasyon çalışmalarında polietilen oksit türevi YAM Poloxamer 188 ve Poloxomer 407 ve non iyonik yüzey aktif maddelerinden Tween 80 ile çalışılmıştır. Ön formülasyon çalışmaları kapsamında hazırlanan formülasyonlarda kullanılan katı lipidin bir kısmı sıvı lipid ile yer değiştirilerek NLC formülasyonları hazırlanmıştır. Bu amaçla argan yağı, badem yağı ve oleik asit gibi farklı doğal yağlar kullanılmıştır.

Ön-emülsiyon oluşturulması maksadıyla katı lipid veya katı lipid sıvı lipid karışımı su banyosunda 70C° sıcaklığa gelene kadar ısıtılmıştır. Kafein ve yüzey aktif madde distile su içerisinde karıştırılarak aynı sıcaklığa kadar ısıtılmıştır. Sıcak yağ karışımının içerisine kafeinin sulu yüzey aktif madde çözeltisi ultra turraks altında ilk grup 8.000 rpm hızda, ikinci grup ise 24.000 rpm hızda 5 dk karıştırılmıştır. Elde edilen sıcak emülsiyon yüksek basınçlı homojenizatörde 650 bar basınç altında 5 döngü olacak şekilde geçirildikten sonra lipidlerin yeniden kristalizasyonu için oda

sıcaklığına kadar soğuması için bekletilmiştir. Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemiyle oluşturulan formülasyonlar Çizelge 2.3’de özetlenmiştir.

**Çizelge 2.3.** Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemiyle hazırlanan yarı katı lipid nanopartiküller

Formülasyon Kodu	Katı Lipid	Lipid Kons.	Sıvı Lipid	Sıvı Lipid Kons.	YAM	YAM Kons.	
1.GRUP	F1	Compritol 888 ATO	%10	-	-	Poloxamer 188	%1,35
						Tween 80	%0,17
	F2	Compritol 888 ATO	%6	Badem Yağı	%4	Poloxamer 188	%1,35
						Tween 80	%0,17
	F3	Compritol 888 ATO	%6	Argan Yağı	%4	Poloxamer 188	%1,35
						Tween 80	%0,17
	F4	Compritol 888 ATO	%9	Argan Yağı	%1	Poloxamer 188	%1,35
						Tween 80	%0,17
	F5	Precirol ATO 5	%8	Argan Yağı	%2	Poloxamer 188	%1,35
						Tween 80	%0,17
F6	Tristearin	%8	Argan Yağı	%2	Poloxamer 188	%1,35	
					Tween 80	%0,17	
F7	Compritol 888 ATO	%20	-	-	Poloxamer 188	%1,35	
					Tween 80	%0,17	
F8	Compritol 888 ATO	%16	Argan Yağı	%4	Poloxamer 188	%0,17	
					Tween 80	%1,35	
F9	Compritol 888 ATO	%18	Argan Yağı	%2	Poloxamer 188	%0,17	
					Tween 80	%1,35	
2. GRUP	F10	Precirol ATO 5	%14	Argan Yağı	%4	Poloxamer 407	%10
	F11	Tristearin	%14	Argan Yağı	%4	Poloxamer 407	%10
	F12	Precirol ATO 5	%18	Argan Yağı	%2	Poloxamer 407	%10
	F13	Tristearin	%18	Argan Yağı	%2	Poloxamer 407	%10
	F14	Precirol ATO 5	%14	Oleik Asit	%4	Poloxamer 407	%10
	F15	Tristearin	%14	Oleik Asit	%4	Poloxamer 407	%10
	F16	Tristearin	%28	Argan Yağı	%12	Poloxamer 407	%10
	F17	Tristearin	%40	-	-	Poloxamer 407	%10



### 2.3.1.2. Yüksek Hızda Karıştırma ve Ultrasonikasyon Yöntemiyle Yarı Katı Lipid Nanopartiküllerin Hazırlanması için Gerçekleştirilen Ön Çalışmalar

Bu yöntemde katı lipid veya katı lipid sıvı lipid karışımı su banyosunda 70C<sup>0</sup> sıcaklığa gelene kadar ısıtılmıştır. Kafein ve YAM distile su içerisinde karıştırılarak aynı sıcaklığa getirilmiştir. Sıcak yağ karışımının içerisine kafeinin sulu YAM çözeltisi ultra turraks altında ilk grup 8.000 rpm hızda, ikinci grup ise 24.000 rpm'de eklenerek 5 dakika boyunca karıştırılmıştır. Elde edilen ön emülsiyon sonikatörde 5 dakika süreyle 30 W amplitütte sonike edilmiştir. Oluşan sıcak lipid nanopartikül dispersiyonu oda sıcaklığında bekletilerek lidiplerin yeniden kristalizasyonu alması sağlanmıştır. Bu yöntem ile hazırlanan yarı katı lipid nanopartiküller Çizelge 2.4'de formülasyon bileşenleri gösterilmiştir.

**Çizelge 2.4.** Yüksek hızda karıştırma ve sonikasyon yöntemiyle hazırlanan yarı katı lipid nanopartiküller

Formül Kodu	Lipid Tipi	Lipid Kons.	Sıvı Lipid Tipi	Sıvı Lipid Kons.	Surfaktan Tipi	Surfaktan Kons.
S1	Compritol 888 ATO	%10	-	-	Poloxamer 188	%1,35
					Tween 80	%0,17
S2	Precirol ATO 5	%10	-	-	Poloxamer 188	%1,35
					Tween 80	%0,17
S3	Tristearin	%10	-	-	Poloxamer 188	%1,35
					Tween 80	%0,17
S4	Stearik Asit	%10	-	-	Poloxamer 188	%1,35
					Tween 80	%0,17
S5	Precirol ATO 5	%18	Argan Yağı	%2	Poloxamer 407	%10
S6	Tristearin	%18	Argan Yağı	%2	Poloxamer 407	%10
S7	Tristearin	%40	-	-	Poloxamer 407	%10
S8	Compritol 888 ATO	%28	Argan Yağı	%12	Poloxamer 407	%10
S9	Stearik Asit	%14	Argan Yağı	%6	Poloxamer 407	%10
S10	Stearik Asit	%21	Argan Yağı	%9	Poloxamer 407	%10
S11	Stearik Asit	%16	Argan Yağı	%4	Poloxamer 407	%10
S12	Stearik Asit	%24	Argan Yağı	%6	Poloxamer 407	%10

Yarı katı lipid nanopartiküllere ait hedef ürün kalite profiline ulaşmayı sağlayan kritik kalite özelliklerinin eldesinde hem literatür bilgileri hem de ön formülasyon çalışmalarında ulaşılan bulgular değerlendirilerek formülasyonların hazırlanmasında kullanılacak üretim yöntemi belirlenmiştir.

### 2.3.1.3. Bilgi Alanı İçerisinde Yarı Katı NLC Formülasyonlarının Hazırlanması

Ön formülasyon çalışmaları ile elde edilen bulgular yarı katı lipid nanopartikül formülasyonlarının oluşturulmasında Yüksek Hızda Karıştırma ve Sonikasyon yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir. Formülasyon çalışmaları kapsamında Compritol 888 ATO, Precirol ATO 5, tripalmitin ve tristearin katı lipidlerden sıvı lipid olarak seçilen argan yağı ile karışımından oluşan NLC formülasyonları oluşturulmuştur. Formüllerdeki toplam lipid yüzdeleri %20 ve % 30 olarak belirlenmiştir. Bu oran içerisinde formülasyonlar katı lipid sıvı lipid oranları (8:2, 7:3) olacak şekillerde hazırlanmıştır. Yüzey aktif madde olarak Poloxamer 407 seçilmiş ve oranı %10 olarak sabitlenmiştir. Formülasyonlara ait kritik parametreler Çizelge 2.5’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.5. Kritik proses parametreleri ve kritik materyal özellikleri

<b>Sulu dış faz hacmi</b>	25 ml
<b>Lipid</b> (Compritol 888 ATO, Precirol ATO 5, Tripalmitin, Tristearin)	% 14 % 16 % 21 % 24
<b>Sıvı lipid yüzdesi</b> (Argan yağı)	% 4 % 6 % 9
<b>Poloxamer 407 konsantrasyonu</b>	% 10 a/h
<b>Etkin madde miktarı</b>	500 mg
<b>Emülsiyon süresi (ultraturraks)</b>	5 dk
<b>Ultraturraks hızı</b>	24000 rpm
<b>Sonikasyon Süresi</b>	5 dk
<b>Sonikasyon Gücü</b>	30 W

Ön-emülsiyon oluşturulması amacıyla katı lipid ve sıvı lipid karışımı su banyosunda 70C° sıcaklığa gelene kadar ısıtılmıştır. Kafein ve Poloxamer 407 distile su içerisinde karıştırılarak aynı sıcaklığa kadar ısıtılmıştır. Sıcak yağ karışımının içerisine kafeinin sulu yüzey aktif madde çözeltisi eklenerek ultra turraks altında 24.000 rpm hızda 5 dk karıştırılmıştır. Elde edilen sıcak ön emülsiyon sonikatörde 30

W güçte 5 dakika sonike edildikten sonra lipidlerin yeniden kristalizasyonu için oda sıcaklığına kadar soğuması için bekletilmiştir. Formülasyonlar 1 gün boyunca buzdolabında 4 C° sıcaklıkta bekletildikten sonra karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. QbD çalışması kapsamında hazırlanması planlanan 16 adet yarı katı NLC formülasyonlarına ait kritik materyal özellikleri Çizelge 2.6’da verilmiştir.

**Çizelge 2.6.** QbD çalışması kapsamında hazırlanan yarı katı NLC formülasyonları.

Formülasyon Kodu	Kafein (%)	BİLEŞENLER (%)					
		Compritol 888 ATO	Precirol ATO 5	Tristearin	Tripalmitin	Argan Yağı	Poloxamer® 407
NLC F1	2	14	-	-	-	6	10
NLC F2	2	21	-	-	-	9	10
NLC F3	2	16	-	-	-	4	10
NLC F4	2	24	-	-	-	6	10
NLC PRE1	2	-	14	-	-	6	10
NLC PRE2	2	-	21	-	-	9	10
NLC PRE3	2	-	16	-	-	4	10
NLC PRE4	2	-	24	-	-	6	10
NLC TS1	2	-	-	14	-	6	10
NLC TS2	2	-	-	21	-	9	10
NLC TS3	2	-	-	16	-	4	10
NLC TS4	2	-	-	24	-	6	10
NLC TP1	2	-	-	-	14	6	10
NLC TP2	2	-	-	-	21	9	10
NLC TP3	2	-	-	-	16	4	10
NLC TP4	2	-	-	-	24	6	10

## 2.3.2. Kontrol Stratejisi Kapsamında Yarı Katı NLC Formülasyonu Üzerinde Yapılan Çalışmalar

### 2.3.2.1. Yarı Katı NLC Formülasyonlarında Partikül Büyüklüğü, Polidispersite İndeksi ve Zeta Potansiyel Tayini

Yarı katı NLC'lerin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli tayini "Dinamik ışık saçınımı" yöntemi ile Zetasizer Nano Series (Nano-ZS) (Malvern Inst., İngiltere) kullanılarak yapılmıştır. Yarı katı NLC'ler ultra saf su ile seyreltilerek partikül boyutları ve polidispersite indeksleri tayin edilmiştir. Cihaz zeta potansiyel ölçümü modunda çalıştırılarak ve aynı örnekler özel küvetlere alınarak, zeta potansiyelleri tayin edilmiştir. 6 kere tekrarlanan ölçümlerin ardından ortalama değer ve standart sapmaları hesaplanmıştır.

### 2.3.2.2. Yarı Katı NLC Formülasyonlarının İşlem Etkinliği (%EE) Tayini

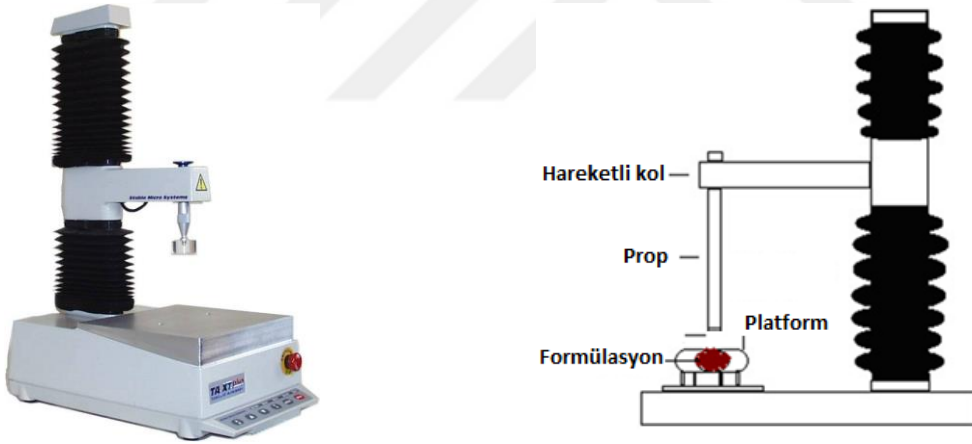
Hazırlanan yarı katı NLC formülasyonlarının miktar tayini yapılması için öncelikle yarı katı NLC'lerden hassas terazi ile 50 mg tartılmış ve üzerine 10 mL metanol eklenerek 2 saat 65 C° sıcaklıkta manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Elde edilen dispersiyon prob sonikatör yardımıyla 5 dakika %100 güç kullanılarak sonike edilmiştir. Sonikasyon sonrasında metanolün uçması ile eksilen miktar tamamlanarak karışım santrifüj tüplerine alınmıştır. Ardından 15 dakika 4 C° sıcaklıkta ve 26000 rpm hızda santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası üstte kalan berrak sıvı kısmından 1 mL alınarak metanolle 10 mL'ye tamamlanmış ve elde edilen supernatantların absorbans değerleri ultraviyole spektrofotometre cihazında okunmuştur. Okunan absorbans değerlerinin kalibrasyon denkleminde yerine konması ile aktif bileşen miktarları belirlenmiş ve Denklem 2.3. kullanılarak % işlem etkinliği hesaplanmıştır. 3 kere tekrarlanan ölçümlerimin ardından ortalama ve standart sapma değerleri bulunmuştur.

#### Denklem 2.3.

$$EE = \frac{\text{NLC'deki etkin bileşen ağırlığı}}{\text{Formülasyonda kullanılan etkin bileşen ağırlığı}} * 100$$

### 2.3.2.3. Yarı Katı NLC Formülasyonlarının Mekanik Özelliklerin Tayini

Hazırlanan NLC formülasyonlarının mekanik özelliklerini tayin etmek için TA-XT Plus Tekstür analiz cihazı (Stable micro systems, Ltd) kullanılmış ve Tekstür Profil Analizleri (TPA) yapılmıştır. Test yapılmak üzere NLC'ler 2 cm çapındaki 20ml'lik silindirik kavanozlara hava kabarcığı olmayacak şekilde yerleştirilmiştir. Ortam sıcaklığı  $25\pm 1$  C° olacak şekilde ayarlandıktan sonra cihazın perspex probu NLC içerisine 2.0 mm/sn hızla 10 mm batırılmış ve NLC yüzeyine geri çekilmiştir. 15 sn beklemenin ardından prob NLC'ye ikinci defa batırılmış ve geri çekilerek test tamamlanmıştır. Her bir NLC formülasyonu için 6 kez tekrarlanan analizler sonunda elde edilen güç zaman eğrileri kullanılarak jellerin sertliği, sıkıştırılabilirliği, adezivliği, kohezivliği, elastikiyet ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. TPA analizi için kullanılan cihazın Şekil 2.1'de resmi ve şematik görünümü verilmiştir. Test için kullanılan parametreler Çizelge 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. TA-XT Plus Tekstür analiz aleti ve şematik görünümü

Çizelge 2.7. TPA Test Parametreleri

<b>Prob</b>	Perspex (10 mm çap)
<b>Test öncesi probun hızı</b>	2.0 mm/saniye
<b>Test esnasında probun hızı</b>	2.0 mm/saniye
<b>Test sonrası probun hızı</b>	2.0 mm/saniye
<b>Hedef modu</b>	Mesafe
<b>Probun NLC'ye batma mesafesi</b>	10.0 mm
<b>Probun ikinci batmadan önce bekleme süresi</b>	15.0 saniye
<b>Teste başlamak için probun hissetmesi gereken kuvvet</b>	0.05 N

#### 2.3.2.4. Yarı Katı NLC Formülasyonlara Ait *In Vitro* Oklüzyon Faktörünün Belirlenmesi

NLC dispersiyonu deriye uygulandığında, nanodispersiyondan suyun buharlaşması nedeniyle cilt yüzeyinde bir film tabakası meydana gelir. Bu film tabakası oklüzif bir etkiye sahiptir ve bu nedenle transepidermal su kaybını azaltır ve cildin nemlenmesini artırır. Bu oklüzif etki partikül büyüklüğüne, lipid konsantrasyonuna, örnek hacmine ve kristalliliğe bağlıdır.

Hazırlanan kafein yüklü yarı katı NLC'lerin oklüzif etkileri *In vitro* oklüzyon testiyle incelenmiştir. Bu amaçla 30 mL distile su koyduğumuz 5cm çaplı silindirik kavanozların üstleri filtre kağıdı(Whatman no: 42, cut off size: 2.5 µm, USA) ile kapatılmıştır. Oluşturulan formüllerden 500 mg tartılarak homojen bir biçimde filtre kağıdı yüzeyine hiç boşluk kalmayacak şekilde yayılmıştır (19,63 cm<sup>2</sup>). Kontrol grubu olarak filtre kağıdı ile örtülmüş silindirik kavanozların üzerine formülasyon uygulanmamıştır. Sonrasında hazırladığımız tüm numuneler 24 saat 37 C° sıcaklıkta %50 relatif nem içeren ortamda tutulmuştur. Silindirik kavanozlar başlangıçta, 6, 12 ve 24. saatlerde tartılmış ve su kaybı saptanmıştır. Tüm formülasyonlar ve kontroller için bu işlem 5 ayrı kavanozda tekrarlanmıştır (n=5). Oklüzyon faktörü "F" Denklem 2.4.'de gösterildiği şekilde hesaplanmıştır. Bu eşitlikte "A" formülasyon uygulanmamış kontrol kavanozlarındaki su kaybını, "B" formül uygulanmış kavanozlardaki su kaybını ifade etmektedir. "F" değerinin 0 olması oklüzif etkinin kontrol ile karşılaştırıldığında olmadığını gösterirken, "F" değerinin 100 olması en yüksek oklüzif etkinin varlığını göstermektedir.

#### Denklem 2.4.

$$F = \left( \frac{A - B}{A} \right) * 100$$

## 2.4. Elde Edilen Verilerin Yapay Sinir Ağları ile Değerlendirilmesi ve Formülasyon Optimizasyonu

Yarı katı NLC formülasyonlarından elde edilen verilerin değerlendirilmesinde "INform V5.01 ANN" isimli ve Intelligensys Ltd. tarafından geliştirilmiş olan sinir ağı yazılım programı paketinden yararlanılmıştır. Bu yazılım girdi olarak sunulan verilerden öğrenir ve "eğer denenirse", verilen aralık içinde bileşen miktarını veya işlem koşulunu değiştirerek formülasyon optimizasyonu sağlar (Aksu, 2010). Programın uygulanmasında, tasarım alanı içerisinde hazırlanan yarı katı NLC formülasyonları ile ilgili girdi ve çıktılar ANN programına aktarılmıştır.

Söz konusu yazılıma ilk olarak verilerin aktarılması gerekmektedir. Yarı katı NLC formülasyonlarının oluşturulmasında kullanılan kritik matelyal özellikleri girdi hanesine, formülasyonlar için belirlenen kritik kalite özellikleri verileri ise çıktı hanesine girilerek programa aktarılmıştır. Bilgi alanı içerisinde ANN yazılım programına aktarılan girdi ve çıktı limitleri Çizelge 2.8.'de Yapay sinir ağı modeli oluşturmak amacıyla hazırlanan 16 adet yarı katı NLC formülasyonu ait girdiler ve çıktıların tamamı ise Çizelge 2.9'da gösterilmiştir.

**Çizelge 2.8.** Yapay sinir ağı programında kullanılan girdi ve çıktılar

<b>Yarı Katı NLC formülasyonları için girdiler</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Lipid miktarı (mg): max min mg miktarları</li><li>• Katı lipid tipi: Compritol 888 ATO/ Precirol ATO 5 Tristearin / Tripalmitin</li><li>• Sıvı lipid: Argan yağı(mg) miktarı</li><li>• Katı lipid/Sıvı lipid oranı</li></ul>
<b>Çıktılar</b>
Partikül Boyutu (nm) Polidispersite İndeksi 12. saatteki oklüzif faktör değeri

**Çizelge 2.9.** Model oluşturmak amacıyla yapay sinir ağı programına aktarılan girdi ve çıktılar

Formül Kodu	GİRİDİ								ÇIKTI		
	Katı Lipid				Argan Yağı (mg)	Kafein (mg)	Poloxamer 407 (mg)	Dış Faz Hacmi(mL)	Part. Boyutu (nm)	PDI	12. saat Oklüzyon
	Compritol 888 ATO (mg)	Precirol ATO 5 (mg)	Tripalmitin (mg)	Tristearin (mg)							
NLC F1	3500	0	0	0	1500	500	2500	25	186,3	0,209	58,361
NLC F2	5250	0	0	0	2250	500	2500	25	247,5	0,251	60,679
NLC F3	4000	0	0	0	1000	500	2500	25	187,5	0,223	60,810
NLC F4	6000	0	0	0	1500	500	2500	25	277,1	0,227	59,046
NLC PRE1	0	3500	0	0	1500	500	2500	25	163,1	0,161	56,368
NLC PRE2	0	5250	0	0	2250	500	2500	25	225,9	0,228	49,837
NLC PRE3	0	4000	0	0	1000	500	2500	25	167,8	0,175	47,224
NLC PRE4	0	6000	0	0	1500	500	2500	25	313,4	0,326	53,250
NLC TS1	0	0	3500	0	1500	500	2500	25	285,7	0,270	39,484
NLC TS2	0	0	5250	0	2250	500	2500	25	226,9	0,178	50,359
NLC TS3	0	0	4000	0	1000	500	2500	25	279,6	0,263	46,375
NLC TS4	0	0	6000	0	1500	500	2500	25	231,1	0,211	35,010
NLC TP1	0	0	0	3500	1500	500	2500	25	323,6	0,267	33,736
NLC TP2	0	0	0	5250	2250	500	2500	25	325,7	0,441	36,512
NLC TP3	0	0	0	4000	1000	500	2500	25	218,9	0,223	41,476
NLC TP4	0	0	0	6000	1500	500	2500	25	320,8	0,477	49,543

Çizelge 2.9’da yer alan girdi ve çıktı değerleri YSA programına aktarılmıştır. Belirlenen değişkenler ve söz konusu veriler yardımıyla sinir ağı modelleri geliştirilmiştir.

Yapay sinir ağı programı programa girdi ve çıktı olarak aktarılan verilerden öğrenen bir sistemdir. Bu amaçla öncelikle optimum öngörülebilirliğe sahip bir sinir ağı modelinin oluşturulabilmesi için belirlenen eğitim parametrelerinin yardımıyla programın eğitim aşaması tamamlanmıştır. Yapay sinir ağının eğitimi tamamlandıktan sonra “sonuçları görme” aşamasına geçilir ve model istatistikleri, eğitim verisi, test verisi ve eğitim günlüğü tabloları elde edilir. Çalışmada geri yayımlı tip ve gizli katmandaki aktarım fonksiyonu parametreleri uygulanmıştır. Programda veri eğitimi tipi olarak geri yayımlı öğrenme algoritmalarından biri olan



RPROP kullanılmıştır. RPROP; sinir ağı üniteleri arasındaki ağırlıkları ayarlayan çok hızlı ve doğru sonuçlar elde edilebilen bir algoritmadır (Florescu ve Igel, 2018; Riedmiller ve Braun, 1993; Saduf ve Wani, 2013).

Elde edilen modelin yorumlanmasında  $r^2$  değerleri aralıkları kullanılır. Yorumlamalar  $r^2$  değerlerinin yüksek oluşuna göre yapılır. Buna göre sonuçlar aşağıdaki şekilde yorumlanır.

$r^2 \geq 0,70$  = **Güvenilir model**

$0,50 \leq r^2 \leq 0,70$  = **Dikkat edilmesi gereken model**

$r^2 \leq 0,50$  = **Güvenilir olmayan model**

Veriler programa aktarıldıktan sonra elde edilen sinir ağı modelleri yukarıdaki aralıklar göz önünde bulundurularak değerlendirilmiş ve uygun bulunan model kullanılarak formülasyon optimizasyonu yapılmıştır.

Eğitim aşamasının tamamlanması modelin optimizasyon için kullanılabilir hale geldiği anlamındadır. Çalışmada elde edilen ve güvenilirliği kanıtlanan model kullanılarak formülasyon optimizasyonu yapılmış ve QbD çalışması kapsamında bu formülasyonun kritik kalite özellikleri incelenmiştir. Optimizasyon çalışmasında kullanılan parametreler Çizelge 2.8.'de görülmektedir.

Optimizasyon, kritik kalite özellikleri ile kritik işlem parametreleri/kritik materyal özellikleri arasındaki ilişkiyi kurarak ulaşmak istediğimiz özelliklerin belirlenmesi ve modelimizde hangi bileşen ve işlem koşullarında elde edilebileceğini bize gösterir. Bu aşamada program üzerinde açılan pencerede, optimizasyon için tahmin edilen veriler elde edilir ve eğer istenirse üç boyutlu grafiklerle destek bilgi sağlanabilir.

Seçilen model kullanılarak elde edilen  $r^2$  değerlerine göre optimizasyonu aşamasında hazırlanan formülasyona ait bileşenler Çizelge 2.10'da yer almaktadır.

**Çizelge 2.10.** YSA Programından elde edilen optimum formülasyon bileşenleri.

<b>Optimum Yarı Katı NLC Formülasyonu</b>	
<i>Compritol 888 ATO (mg)</i>	0
<i>Precirol ATO 5(mg)</i>	2600
<i>Tripalmitin (mg)</i>	0
<i>Tristearin (mg)</i>	1650
<i>Argan yağı</i>	1400
<i>Kafein (mg)</i>	500
<i>Poloxamer 407 (mg)</i>	2500
<i>Dış Faz Hacmi (mL)</i>	25

## **2.5. Optimum Formülasyon Üzerinde Yapılan Çalışmalar**

### **2.5.1. Optimum Formülasyon Kritik Kalite Özelliklerine Ait Çalışmalar**

Optimum formülasyon için partikül boyutu, PDI ve 12. saate ait *in vitro* oklüzyon faktörü değeri kritik kalite özellikleri olarak belirlenmiş ve sırası ile Bölüm 2.3.4.1.'de ve Bölüm 2.3.4.4.'de anlatıldığı şekilde tayin edilmiştir. Ürün kalitesine doğrudan etkisi olmadığı düşünülen zeta potansiyeli ve 6. ve 24. saate ait *in vitro* oklüzyon faktörü değerleri de benzer şekilde ölçülmüştür. Piyasadan temin edilen ve selülitin kozmetik bakımında kullanılan jel yapısındaki bir ürünün *in vitro* oklüzyon faktörü değeri de aynı yöntemle tayin edilmiştir. Yüzde işlem etkinliği ise Bölüm 2.3.4.2.'de anlatıldığı şekilde ; optimum formülasyon mekanik özellikleri tayini bölüm 2.3.4.3'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Optimum formülasyonun mekanik özelliklerini kıyaslamak amacıyla piyasadan temin edilen selülitin kozmetik bakımında kullanılan 3 ayrı formülasyonun da mekanik özellikleri aynı şekilde tayin edilmiştir.

## 2.5.2. Optimum Formülasyon Üzerinde Yapılan İn Vitro Etkin Madde Salım Tayini

Optimum formülasyonun *in vitro* salım çalışması hem "Franz Difüzyon Hücresi Yöntemi" hem de "Statik Yöntem" ile gerçekleştirilmiştir.

### 2.5.2.1. Franz Difüzyon Hücresi Çalışması

Hazırlanan formülasyonların *in vitro* salım çalışmaları hücre yüzey alanı 3.14 cm<sup>2</sup> hücre alanı olan Franz Difüzyon Hücreleri ile yapılmıştır. Çalışmamızda reseptör faz olarak pH 7,4 PBS tamponu reseptör faz olarak kullanılmıştır ve reseptör faz hacmi 28 mL'dir. Membran olarak, öncelikle distile su ile yıkanmış ve sonra pH 7,4 PBS ile hidrate edilmiş rejenere selüloz asetat diyaliz membran Spectra/Por 2®, MWCO: 12-14 kDa, Spectrum Lab., ABD) kullanılmıştır.

Hazırlanan optimum formülasyondan 50 mg kafein içerecek şekilde tartılmış ve Franz difüzyon hücrelerinin donör fazına diyaliz membran üzerine hava kabarcığı kalmayacak şekilde konulmuştur. Sistem sıcaklığı 37C°'ye ayarlanmıştır. Reseptör faz manyetik karıştırıcı ile 100 rpm'de sürekli olarak karıştırılmıştır. Belirlenen zaman aralıklarında (15, 30 dakika; 1, 2, 4, 6, 12 saat) 0,5 ml örnek alınarak toplanmış ve örnek alınan miktarda pH 7,4 PBS tamponu reseptör faza eklenerek hacim sabit tutulmuştur.

Alınan örneklerin UV Spektrofotometre ile 273 nm dalga boyundaki absorpsanları ölçülerek içerdikleri kafein miktarları hesaplanmıştır. Dört paralel olarak gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda etkin madde olan kafeinin zamana karşı açığa çıkan yüzde miktarları grafiğe geçirilerek salım profilleri çizilmiştir.

### 2.5.2.2. Statik Yöntem

Statik Yöntem ile yaptığımız *in vitro* salım çalışmalarımız için optimum formülasyon 50 mg kafein içerecek şekilde tartılmıştır. Tartılan formülasyon, önce distile su ile yıkanan ve sonra pH 7,4 PBS ile hidrate edilen rejenere selüloz asetat diyaliz membranının (Spectra/Por 2® / MW 12 – 14 kDa ,Spectrum Lab, ABD) içerisine alınmış ve iki ucu kapatılmıştır. Hazırlanan membranlar, içerisinde 100 ml pH 7.4 PBS tamponu bulunan kavanozlara yerleştirilmiştir. Kavanozların üstü kapak ile kapatılarak 37°C'deki termostatlı çalkalayıcı su banyosunda 50 rpm hızda sürekli karıştırılmıştır. Belirli zamanlarda (15, 30 dakika; 1, 2, 4, 6, 12 saat) sistem içerisinden 1 ml örnek alınmış ve alınan örneğin UV Spektrofotometre ile 273 nm dalga boyundaki absorbansları ölçülmüştür. Alınan örnek yerine taze pH 7.4 PBS tamponu eşit miktarda sisteme ilave edilmiştir.

Dört paralel olarak gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda etkin madde olan kafeinin zamana karşı açığa çıkan yüzde miktarları grafiğe geçirilerek salım profilleri çizilmiştir.

### 2.5.3. Optimum Formülasyon Üzerinde Yapılan Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC) Analizi

Optimum yarı katı NLC formülasyonun üretiminde kullandığımız lipidlerden Precirol ATO 5 ve Tristearin'in, kafein eklenmemiş boş formülasyonun ve kafein yüklü optimum NLC formülasyonunun diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) analizi yapılmıştır. Yarı katı NLC formülasyonları içerisinde bulunan suyun 100C°'lerde geniş bir aralıkta pikinin karışmasını engellenmesi amacıyla derin dondurucuda -20C° sıcaklıkta dondurulmuş ve ardından liyofilize edilmiştir. Bunun için yaklaşık 3 mg ağırlığındaki örnekler alüminyum pan içine konmuş ve hermetik olarak kapatılarak cihaza yerleştirilmiştir. Örnekler 25-350°C aralığında ve 40 ml/dakika azot gazı akımı altında 5°C/dakika hızla ısıtıldı ve optimum formüller

içerisindeki lipidler, etkin madde içermeyen NLC formülasyonu ve etkin madde içeren NLC formülasyonunun DSC termogramları alınmıştır.

#### **2.5.4. Optimum Formülasyonda Yapılan Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM) Analizi**

Hazırlanan optimum yarı katı lipid NLC formülasyonunun morfolojik özellikleri, “Geçirimli Elektron Mikroskopu” (Hitachi High Tech HT7700) kullanılarak incelenmiştir. Bunun için, yarı katı lipid nanopartiküller distile su içinde disperse edilerek bakır ızgaralara uygulanmış ve mikroskoba yerleştirilerek 120 kV voltaj ile görüntülenmiştir.\*

#### **2.5.5. Optimum Formülasyonda Yapılan pH ve Viskozluk Ölçümleri**

Optimum olarak belirlenen NLC formülasyonunun viskozite ölçümü rotasyon tipi viskozimetre (Brookfield DV II) ile  $25\pm 1$  C° sıcaklıkta, T96 kodlu ölçüm çubuğu kullanılarak 5-10-20 rpm’de ölçülmüştür. 6’şar kez tekrarlanan ölçümler sonucunda elde edilen viskozite değerlerinin ortalama ve SS değeri hesaplanmıştır.

Yarı katı NLC formülasyonu 1’e 10 oranında distile su ile seyreltilerek pH metre ile ölçümleri yapılmıştır. 3'er kez tekrarlanan ölçümler sonucunda elde edilen pH değerlerinin ortalama ve SS değerleri hesaplanmıştır.

---

\* TEM analizindeki desteklerinden dolayı World Medicine İlaç San. ve Tic. A.Ş. den Sayın Metin Karabulut'a teşekkür ederiz.

### 2.5.6. Stabilite Çalışmaları

Hazırlanan formülasyonların karakterizasyonlarında tayin edilen parametreler ele alınarak, stabilite kabinlerinde (Nüve İD 501) 25C° sıcaklık ve % 60 relatif nem koşullarında stabilite çalışması yapılmıştır. 1. Ayın sonunda partikül büyüklüğü, ve polidispersite indeksi tayini bölüm 2.3.4.1.'de anlatıldığı şekilde, işlem etkinliği bölüm 2.3.4.2.'de anlatıldığı şekilde, pH ve viskozite ölçümleri de Bölüm 2.4.7'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Stabilite çalışmalarının 1. Ay sonuçları alınmış olup, devam etmektedir.

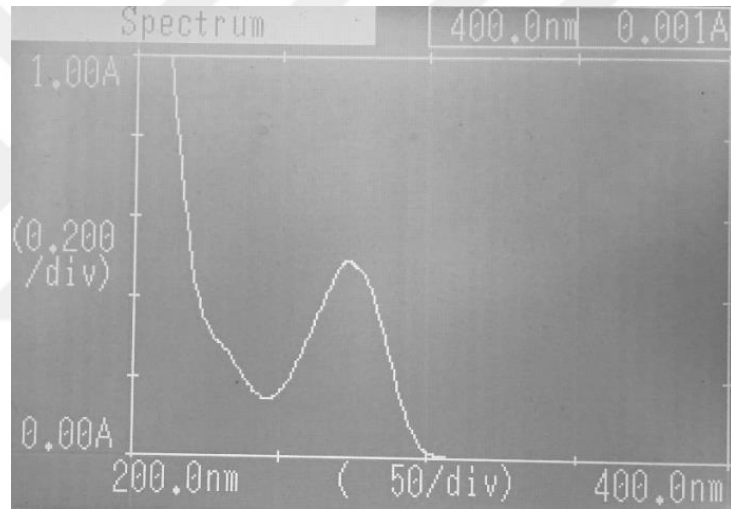


### 3. BULGULAR

#### 3.1. Kafein ile Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular

##### 3.1.1. Kafeinin UV Spekturumu

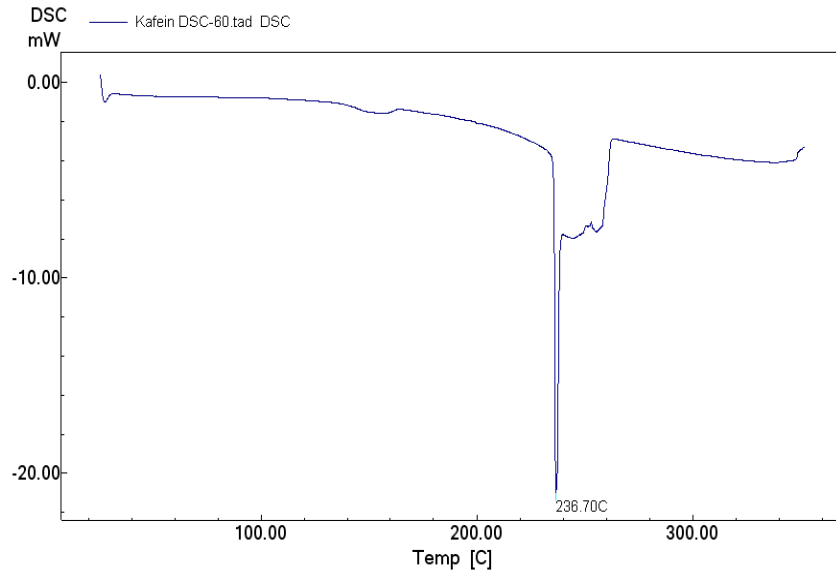
Kafeinin UV spekturumu metanol ve pH 7,4 PBS ortamlarında Bölüm 2.2.1’de açıklandığı üzere alınmıştır. Kafeinin en yüksek absorbans verdiği dalga boyu her iki ortamda da 273 nm olarak tespit edilmiştir. Elde edilen UV spekturumu Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Kafeinin UV spekturumu.

##### 3.1.2. Kafeinin Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC) Analizi

Saf halde bulunan kafeinin termal analizi bölüm 2.2.2’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Kafeine ait termogram Şekil 3.2’de gösterilmiştir.

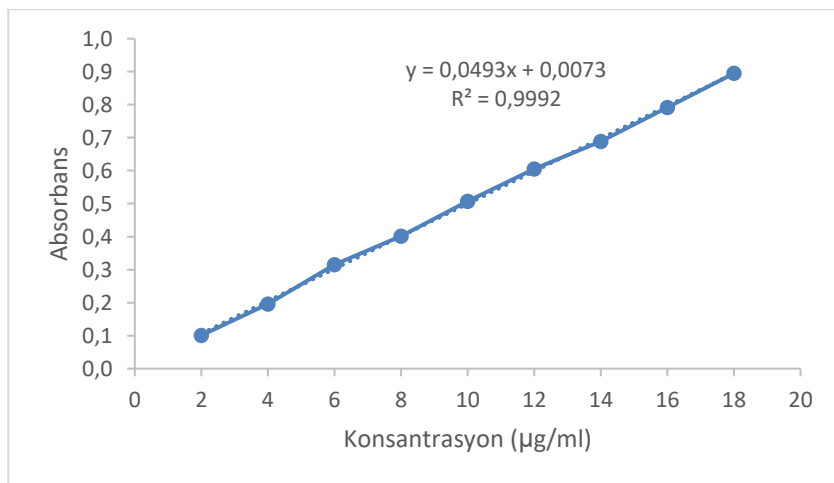


**Şekil 3.2.** Kafeinin Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC) Termogramı

### 3.1.3. Kafeinin Kalibrasyon Doğrularının Belirlenmesine Ait Bulgular

#### 3.1.3.1. Kafeinin Metanol İçindeki Kalibrasyon Doğrusuna Ait Bulgular

Kafeinin metanol ortamındaki kalibrasyon doğrusu bölüm 2.2.3.2’de anlatıldığı gibi çizilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrusu, doğru denklemi ve determinasyon katsayısı ( $r^2$ ) Şekil 3.3’de gösterilmiştir.

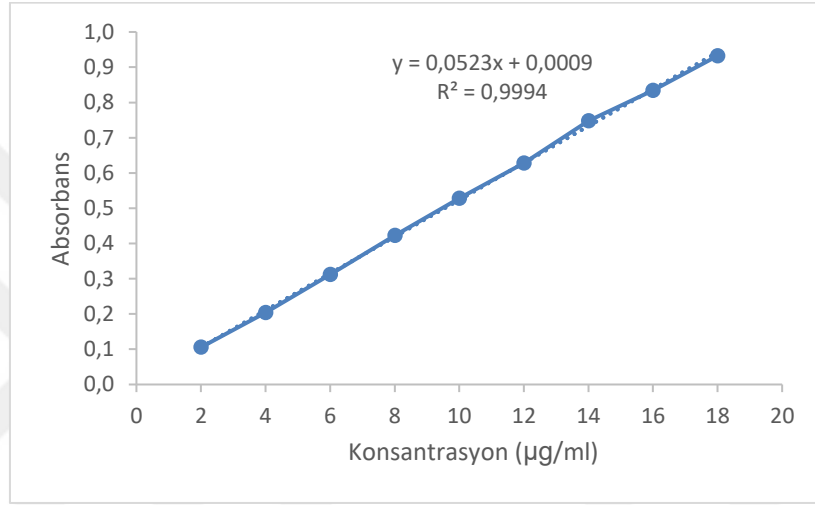


**Şekil 3.3.** Kafeinin Metanol Ortamında UV 273 nm’deki Kalibrasyon Doğrusu



### 3.1.3.2. Kafeinin pH 7,4 PBS Tamponu İçindeki Kalibrasyon Doğrusuna Ait Bulgular

Kafeinin pH 7,4 PBS tamponundaki kalibrasyon doğrusu bölüm 2.2.3.3’de anlatıldığı gibi çizilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrusu, doğru denklemi ve determinasyon katsayısı ( $r^2$ ) Şekil 3.4’de gösterilmiştir.

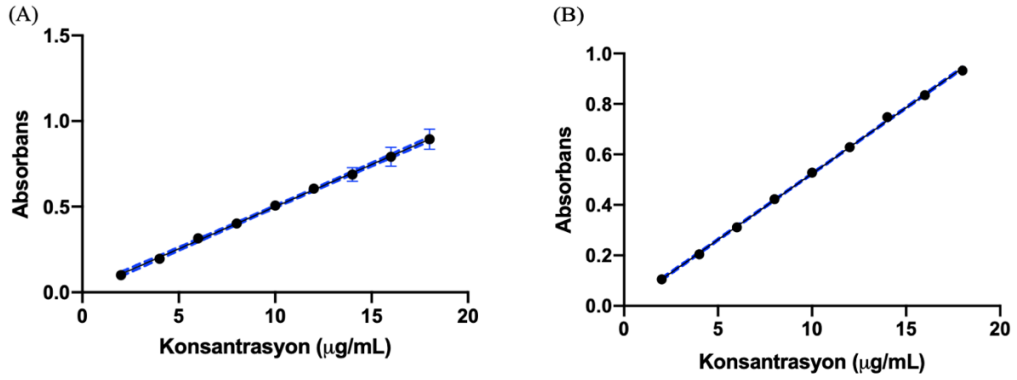


Şekil 3.4. Kafeinin pH 7,4 PBS Ortamında UV 273 nm’deki Kalibrasyon Doğrusu

### 3.1.4. Kafeinin Miktar Tayini Yönteminin Analitik Validasyonuna Ait Bulgular

#### 3.1.4.1. Doğrusallık ve Aralığı

Kafeinin metanol ve pH 7.4 PBS ortamındaki doğrusallığı bölüm 2.2.4.1’de açıklandığı gibi belirlenmiştir. Elde edilen doğrular Şekil 3.5, doğrulara ait veriler ise Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.



**Şekil 3.5.** Kafeinin metanoldaki (A) ve pH 7,4 PBS tamponundaki (B) miktar tayini yönteminin doğrusallık ve aralığı çalışmasına ait doğrular

**Çizelge 3.1.** Kafeinin metanoldaki ve pH 7,4 PBS tamponundaki miktar tayini yönteminin doğrusallık ve aralığı çalışmasına ait veriler

	Metanol	pH 7,4 PBS
Eğim (m) ± Güven Sınırı (%95)	0,0492 ± 0,0006	0,0523 ± 0,0002
Standart hata	0,0479 - 0,0507	0,0518-0,0527
Kesişim (n) ± Güven Sınırı (%95)	0,0073 ± 0,0078	0,0009 ± 0,0027
Standart hata	-0,0082 - 0,0229	-0,0045 -0,0064
Korelasyon katsayısı (r)	0,9922	0,9992
Regresyon katsayısı (r <sup>2</sup> )	0,9845	0,9983
Regresyon doğrusu ile elde edilen sapmaların standart sapması (S <sub>y.x</sub> )	0,0323	0,0113

### 3.1.4.2. Doğruluk ve Geri Elde

Miktar tayin yöntemine ait geri elde edilebilirlik, standart sapma ve %bağlı sapma değerleri bölüm 2.2.4.2'de belirtilen konsantrasyonlar kullanılarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2 ve 3.3'de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Kafeinin metanoldeki UV spektrum yöntemi ile belirlenen geri elde edilebilirlik testine ait veriler

Teorik kons. (µg/ml)	Pratik kons. (µg/ml)	% Geri Elde	Teorik kons. (µg/ml)	Pratik kons. (µg/ml)	% Geri Elde	Teorik kons. (µg/ml)	Pratik kons. (µg/ml)	% Geri Elde
4	3,95	98,73	10	9,79	97,91	16	14,94	93,40
4	3,89	97,21	10	9,77	97,71	16	14,86	92,89
4	3,89	97,21	10	9,79	97,91	16	14,88	93,02
4	3,95	98,73	10	9,83	98,32	16	14,90	93,14
4	3,91	97,72	10	9,81	98,11	16	14,92	93,27
4	3,93	98,23	10	9,81	98,11	16	14,92	93,27
<b>Ort. % Geri Elde</b>		<b>97,97</b>	<b>Ort. % Geri Elde</b>		<b>98,01</b>	<b>Ort. % Geri Elde</b>		<b>93,16</b>
<b>SS*</b>		<b>0,70</b>	<b>SS*</b>		<b>0,21</b>	<b>SS*</b>		<b>0,19</b>
<b>%BS**</b>		<b>0,71</b>	<b>%BS**</b>		<b>0,22</b>	<b>%BS**</b>		<b>0,20</b>

**Çizelge 3.3.** Kafeinin pH 7.4 PBS tamponundaki UV spektrum yöntemi ile belirlenen geri elde edilebilirlik testine ait veriler

Teorik kons. (µg/ml)	Pratik kons. (µg/ml)	% Geri Elde	Teorik kons. (µg/ml)	Pratik kons. (µg/ml)	% Geri Elde	Teorik kons. (µg/ml)	Pratik kons. (µg/ml)	% Geri Elde
4	3,90	97,56	10	9,93	99,25	16	15,38	96,09
4	3,85	96,13	10	9,93	99,25	16	15,45	96,57
4	3,85	96,13	10	10,12	101,17	16	15,49	96,81
4	3,90	97,56	10	9,89	98,87	16	15,49	96,81
4	4,00	99,95	10	10,06	100,59	16	15,82	98,84
4	4,00	99,95	10	9,89	98,87	16	15,64	97,77
<b>Ort. % Geri Elde</b>		<b>97,88</b>	<b>Ort. % Geri Elde</b>		<b>99,67</b>	<b>Ort. % Geri Elde</b>		<b>97,15</b>
<b>SS*</b>		<b>1,73</b>	<b>SS*</b>		<b>0,97</b>	<b>SS*</b>		<b>0,99</b>
<b>%BS**</b>		<b>1,77</b>	<b>%BS**</b>		<b>0,97</b>	<b>%BS**</b>		<b>1,02</b>

### 3.1.4.3. Kesinlik

#### 3.1.4.3.1. Tekrar Edilebilirlik

Kafeinin 2.2.4.3.1 bölümünde belirtilen konsantrasyonda örnekleri UV Spekturumunda 273 nm dalga boyunda 6 kez okundu. Okunan absorbanlar ve bu absorbanlara karşılık gelen pratik konsantrasyon değerleri Çizelge 3.4 ve 3.5’de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.4.** Kafeinin metanol ve pH 7,4 PBS miktar tayini yönteminin tekrar edilebilirlik çalışması sonuçları

Metanol		pH 7,4 PBS ortamı	
Absorbans	Konsantrasyon (10µg/mL)	Absorbans	Konsantrasyon (10µg/mL)
0,490	9,791	0,520	9,925
0,489	9,771	0,520	9,925
0,490	9,791	0,530	10,117
0,492	9,832	0,518	9,887
0,491	9,811	0,527	10,059
0,491	9,811	0,518	9,887
<b>ORT</b>	<b>9,801</b>	<b>ORT</b>	<b>9,967</b>
<b>SS</b>	<b>0,021</b>	<b>SS</b>	<b>0,097</b>
<b>%BS</b>	<b>0,217</b>	<b>%BS</b>	<b>0,974</b>

#### 3.1.4.3.2. Ara Kesinlik

Kafeinin metanol ve pH 7.4 PBS ortamındaki miktar tayini yönteminin ara kesinliğinin tespit edilmesine yönelik çalışmalar, Bölüm 2.2.4.3.2.'de belirtildiği şekilde yapılmıştır. Elde edilen veriler Çizelge 3.5 ve 3.6’da görülmektedir.

**Çizelge 3.5.** Kafeinin metanoldeki miktar tayini yönteminin ara kesinlik çalışması sonuçları

4 µg/ml			10 µg/ml			16 µg/ml		
Analist	Absorbans	Kons. (µg/ml)	Analist	Absorbans	Kons. (µg/ml)	Analist	Absorbans	Kons. (µg/ml)
1	0,202	3,949	1	0,490	9,791	1	0,742	14,903
1	0,199	3,888	1	0,490	9,791	1	0,735	14,761
1	0,199	3,888	1	0,490	9,791	1	0,736	14,781
1	0,202	3,949	1	0,492	9,832	1	0,739	14,842
1	0,200	3,909	1	0,491	9,811	1	0,739	14,842
1	0,201	3,929	1	0,491	9,811	1	0,741	14,882
2	0,205	4,010	2	0,489	9,771	2	0,744	14,943
2	0,204	3,990	2	0,490	9,791	2	0,740	14,862
2	0,207	4,051	2	0,492	9,832	2	0,741	14,882
2	0,206	4,030	2	0,495	9,892	2	0,742	14,903
2	0,207	4,051	2	0,496	9,913	2	0,743	14,923
2	0,204	3,990	2	0,497	9,933	2	0,743	14,923
<b>Ort. Kons. (µg/ml) (n=12)</b>		<b>3,970</b>	<b>Ort. Kons. (µg/ml) (n=12)</b>		<b>9,830</b>	<b>Ort. Kons. (µg/ml) (n=12)</b>		<b>14,871</b>
<b>SS*</b>		<b>0,0593</b>	<b>SS*</b>		<b>0,054</b>	<b>SS*</b>		<b>0,0564</b>
<b>%BS**</b>		<b>1,49375</b>	<b>%BS**</b>		<b>0,546</b>	<b>%BS**</b>		<b>0,379</b>

**Çizelge 3.6.** Kafeinin pH 7.4 PBS tamponundaki miktar tayini yönteminin ara kesinlik çalışması sonuçları.

4 µg/ml			10 µg/ml			16 µg/ml		
Analist	Absorbans	Kons. (µg/ml)	Analist	Absorbans	Kons. (µg/ml)	Analist	Absorbans	Kons. (µg/ml)
1	0,211	4,017	1	0,520	9,925	1	0,805	15,375
1	0,211	4,017	1	0,520	9,925	1	0,809	15,451
1	0,216	4,113	1	0,530	10,117	1	0,811	15,489
1	0,214	4,075	1	0,518	9,887	1	0,811	15,489
1	0,213	4,055	1	0,527	10,059	1	0,828	15,815
1	0,214	4,075	1	0,518	9,887	1	0,819	15,642
2	0,215	4,094	2	0,523	9,983	2	0,814	15,547
2	0,222	4,228	2	0,522	9,964	2	0,817	15,604
2	0,218	4,151	2	0,523	9,983	2	0,812	15,509
2	0,220	4,189	2	0,521	9,945	2	0,812	15,509
2	0,218	4,151	2	0,522	9,964	2	0,822	15,700
2	0,219	4,170	2	0,527	10,059	2	0,813	15,528
<b>Ort. Kons. (µg/ml) (n=12)</b>		<b>4,111</b>	<b>Ort. Kons. (µg/ml) (n=12)</b>		<b>9,975</b>	<b>Ort. Kons. (µg/ml) (n=12)</b>		<b>15,555</b>
<b>SS*</b>		<b>0,067457</b>	<b>SS*</b>		<b>0,0713</b>	<b>SS*</b>		<b>0,11884</b>
<b>%BS**</b>		<b>1,640815</b>	<b>%BS**</b>		<b>0,7147</b>	<b>%BS**</b>		<b>0,76399</b>

SPSS istatistik programı yardımıyla yapılan bağımlı örneklem T testi (Paired-Sample T Test) sonucunda %95 güven seviyesinde ortalamalar arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ( $p>0,05$ ). Ayrıca varyasyon katsayısı değerlerinin de %2'nin altında olduğu görülmüştür.

#### 3.1.4.4. Teşhis ve Tayin Sınırları

Kafeinin metanol ve pH 7,4 PBS ortamındaki miktar tayini yönteminin teşhis ve tayin sınırları Bölüm 2.2.4.4.'te anlatıldığı şekilde hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 3.7 'de verilmiştir.

**Çizelge 3.7.** Kafeinin Metanol ve pH 7,4 PBS ortamındaki miktar tayini yönteminin teşhis ve tayin sınırları

Çalışma Ortamı	Doğru Denklemi	Teşhis Sınırı ( $\mu\text{g/ml}$ )	Tayin Sınırı ( $\mu\text{g/ml}$ )
Metanol	$y = 0,0493x + 0,0073$	0,278	0,841
pH 7.4 PBS	$y = 0,0523x + 0,0009$	0,403	1,221

#### 3.1.4.5. Özgünlük

Yöntemin aktif bileşen olan kafeine özgünlüğünün incelenmesi bölüm 2.1.4.5'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Kafein içermeyen lipid nanopartiküllerin 190-400 nm dalga boyunda spekturumlarına bakıldığında kafeinin en yüksek absorbans değeri verdiği dalga boyunda herhangi bir pike rastlanmamıştır.

#### 3.1.4.6. Kafeinin Kısa Süreli Stabilite Tayini Sonuçları

Kafeinin metanol ve pH 7.4 PBS ortamındaki kısa süreli stabilitesinin tayini Bölüm 2.1.4.6'da anlatılan yöntem kullanılarak çalışılmıştır. Elde edilen değerlerin %BS'sinin % 2 nin altında bulunmuştur. Bulgular, Çizelge 3.8'de sunulmuştur.

**Çizelge 3.8.** Kafeinin kısa süreli stabilitesi

Stabilite	Konsantrasyon (µg/mL)	Başlangıç	24. saat	48. saat	%BS
Metanol	10	9,81	9,69	9,53	1,202
pH 7,4 PBS	10	10,28	9,98	10,02	1,650

## **3.2. Farmasötik Gelişim ve Tasarımla Kalite Çalışmalarına Ait Bulgular**

### **3.2.1. Ön Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular**

#### **3.2.1.1. Yüksek Basıncılı Homojenizasyon Yöntemiyle Yarı Katı Lipid Nanopartiküllerin Hazırlanmasına Ait Bulgular**

Lipid nanopartiküllerin hazırlanmasında ilk yöntem olarak seçilen yüksek basınçlı homojenizasyon tekniği ile iki farklı grup yarı katı lipid nanopartikül oluşturulması denenmiştir.

1. grup formülasyonlarda YAM olarak Poloxamer 188 ve Tween 80 bir arada kullanıldığında HPH yöntemi ile lipid nanopartikül oluşumu gözlenmemiştir. Denenen tüm formülasyonların partikül boyutları 1 µm üzerindedir. İkinci grup, Poloxamer 407 ile hazırlanan formülasyonlarda ise lipid nanopartiküller oluşmuş fakat elde etmeyi amaçladığımız yarı katı kıvam çalışılan en yüksek katı lipid konsantrasyonunda dahi elde edilememiştir. Bu sebeple yüksek basınçlı homojenizasyon tekniği ile çalışmaktan vazgeçilmiştir.

Ön formülasyon çalışmalarında hazırlanan formülasyonların partikül boyutu, polidispersite indeksi değerleri ve morfolojik kontroller ile elde edilen yapı özellikleri Çizelge 3.9 ve 3.10’da gösterilmiştir.

**Çizelge 3.9.** Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemiyle hazırlanan 1.Grup lipid nanopartiküllere ait bulgular (n=6).

Formül Kodu	Partikül Boyutu	PDI	Yapısal Özellik
F1	Okunamadı (Partikül oluşmadı)	-	Akışkan sıvı
F2	Okunamadı (Partikül oluşmadı)	-	Akışkan sıvı
F3	Okunamadı (Partikül oluşmadı)	-	Akışkan Sıvı
F4	Okunamadı (Partikül oluşmadı)	-	Akışkan Sıvı
F5	Okunamadı (Partikül oluşmadı)	-	Akışkan Sıvı
F6	Okunamadı (Partikül oluşmadı)	-	Akışkan Sıvı
F7	Okunamadı (Partikül oluşmadı)	-	Akışkan Sıvı
F8	Okunamadı (Partikül oluşmadı)	-	Akışkan Sıvı
F9	Okunamadı (Partikül oluşmadı)	-	Akışkan Sıvı

**Çizelge 3.10.** Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemiyle hazırlanan 2.grup lipid nanopartiküllere ait bulgular (n=6)

Formül Kodu	Partikül Boyutu	PDI	Yapısal Özellik
F10	135,1±1,232	0,133±0,010	Akışkan Sıvı
F11	145,8±1,155	0,128±0,015	Akışkan Sıvı
F12	150,3±0,611	0,212±0,022	Akışkan Sıvı
F13	150,4±2,463	0,138±0,011	Akışkan Sıvı
F14	122,5±0,890	0,171±0,011	Akışkan Sıvı
F15	126,8±1,336	0,200±0,010	Akışkan Sıvı
F16	163,8±1,825	0,153±0,021	Akışkan Sıvı
F17	167,3±2,536	0,161±0,019	Akışkan Sıvı

### 3.2.1.2. Yüksek Hızda Karıştırma ve Ultrasonikasyon Yöntemiyle Yarı Katı Lipid Nanopartiküllerin Hazırlanmasına Ait Bulgular

Ön formülasyon çalışmalarında denenen yüksek hızda karıştırma ve ultrasonikasyon çalışmaları 2.3.1.2. bölümünde anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Hazırlanan formülasyonların partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri Malvern Zetasizer Nano-Zs cihazı yardımıyla tespit edilmiştir ve veriler Çizelge 3.11’de özetlenmiştir.



Katı lipid olarak stearik asit kullanıldığında, formülasyonların yapılarının çok katı olduğu ve partikül boyutu ile polidispersite indeksi değerlerinin de hedeflediğimiz sınırlar içinde olmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle stearik asit formülasyon çalışmalarından elimine edilmiştir. Lipidlerden Precirol ATO 5, Compritol 888 ATO, Tristearin ve Tripalmitin ile oluşturulan formülasyonlar gerek partikül boyutları gerekse yapısal özellikleri ile uygun bulunmuş ve final formülasyonların oluşturulması maksadıyla bu dört katı lipid seçilmiştir.

Denenen %10-%40 aralığında lipid miktarlarından en uygun sonuçlar ve sürülebilme özellikleri en iyi olan formülasyonlar %20-%30 lipid yüzdesinde bulunmuştur. %10 lipid ile oluşturulan formülasyonlar çok akışkan yapıya iken %40 lipid oranına sahip formülasyonlar ile çok katı yapı elde edilmiştir.

**Çizelge 3.11.** Yüksek hızda karıştırma ve sonikasyon yöntemiyle hazırlanan lipid nanopartiküllere ait bulgular (n=6)

Formül Kodu	Partikül Boyutu	PDI	Yapısal Özellik
S1	306±3,285	0,271±0,007	Yarı Katı Form
S2	326,1±3,405	0,318±0,03	Yarı Katı Form
S3	1'in üstünde	Okunamadı	Akışkan Sıvı
S4	330,3±6,479	0,275±0,031	Yarı Katı Form
S5	150,3±0,611	0,212±0,022	Yarı Katı Form
S6	150,4±2,463	0,138±0,011	Yarı Katı Form
S7	701±30,59	0,649±0,131	Çok Katı
S8	573,2±19,47	0,548±0,066	Çok katı
S9	548,5±18,18	0,659±0,015	Çok katı
S10	837,8±36,92	0,817±0,020	Çok katı
S11	1,669±697,4	0,951±0,063	Çok katı
S12	417,3±49,08	0,547±0,133	Çok katı

### 3.2.2. Bilgi Alanı İçerisinde Yarı Katı NLC Formülasyonlarının Hazırlanmasına Ait Bulgular

Yapılan ön denemeler sonucunda hedeflenen kritik kalite özelliklerine ulaşılabilmesi için seçilen yöntemle ait parametreler Bölüm 2.3.1.3’de verilmiştir. Üretim yöntemi olarak yüksek hızda karıştırma ve ultrasonikasyon yöntemi seçilmiş ve yöntemle ait kritik işlem parametreleri ön formülasyonlarla belirlenmiştir. Hazırlanan yarı katı NLC’lerde kritik kalite özelliklerinden partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve in vitro oklüzyon çalışmaları tamamlanmış, kritik olmayan kalite özelliklerinden ise zeta potansiyel tayinleri yapılmış; mekanik özellikleri incelenmiş; miktar tayini, % işlem etkinlikleri hesaplanmıştır.

### 3.2.3. Kontrol Stratejisi Kapsamında Yarı Katı NLC Formülasyonu Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular

#### 3.2.3.1. Yarı Katı NLC Formülasyonlarında Partikül Büyüklüğü, Polidispersite İndeksi ve Zeta Potansiyel Tayinine Ait Bulgular

Yarı katı NLC’lerin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli tayini bölüm 2.3.2.1.’de gösterildiği şekilde yapılmıştır. Hazırlanan 16 farklı yarı katı NLC formülüne ait partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli ölçümlerine ait sonuçlar Çizelge 3.12’de verilmiştir.

**Çizelge 3.12.** NLC formülasyonlarına ait partikül büyüklükleri, PDI ve zeta potansiyeli değerleri (n=6)

Formülasyon Kodu	Partikül Boyutu (nm±SS)	PDI (Ortalama±SS)	Zeta Potansiyeli (mV±SS)
NLC F1	186,3±1,891	0,209±0,010	-21,2±1,662
NLC F2	247,5±3,504	0,251±0,027	-33,0±0,493
NLC F3	187,5±2,082	0,223±0,013	-26,7±0,513
NLC F4	277,1±4,784	0,227±0,008	-26,8±0,354
NLC PRE1	163,1±1,313	0,161±0,019	-21,6±0,404
NLC PRE2	225,9±1,412	0,228±0,016	-16,0±0,312
NLC PRE3	167,8±2,754	0,175±0,016	-20,2±1,28
NLC PRE4	313,4±18,10	0,326±0,052	-26,4±0,10
NLC TS1	285,7±4,108	0,270±0,016	-26,5±0,763
NLC TS2	226,9±2,205	0,178±0,012	-24,6±2,61
NLC TS3	279,6±3,087	0,263±0,026	-16,8±0,576
NLC TS4	231,1±1,132	0,211±0,012	-16,9±1,26
NLC TP1	323,6±6,572	0,267±0,027	-19,6±1,36
NLC TP2	325,7±19,42	0,441±0,038	-25,4±0,366
NLC TP3	218,9±2,639	0,223±0,013	-9,55±3,33
NLC TP4	320,8±16,72	0,477±0,020	-23,3±0,29

### 3.2.3.2. Yarı Katı NLC Formülasyonlarının İşlem Etkinliği (%EE) Tayinine Ait Bulgular

Hazırlanan yarı katı NLC formülasyonlarına yüklenen kafein miktarı Bölüm 2.3.2.2.'de anlatılan yöntemle bulunmuştur. Denklem 2.3.'de verilen eşitlik kullanılarak % işlem etkinliği değeri hesaplanmıştır. Hazırlanan yarı katı NLC formülasyonlara ait %EE bulguları Çizelge 3.13.'de gösterilmektedir.

**Çizelge 3.13.** NLC formülasyonlarına ait %EE değerleri (n=6)

Formülasyon Kodu	% İşlem Etkinliği (%EE)
NLC F1	96,52±7,29
NLC F2	92,67±8,91
NLC F3	97,35±2,80
NLC F4	100,03±4,28
NLC PRE1	94,06±0,42
NLC PRE2	93,87±2,59
NLC PRE3	92,90±5,28
NLC PRE4	92,63±7,53
NLC TS1	97,06±0,61
NLC TS2	99,63±2,14
NLC TS3	94,45±3,07
NLC TS4	98,55±5,16
NLC TP1	94,24±4,32
NLC TP2	94,89±2,49
NLC TP3	93,44±1,38
NLC TP4	97,15±4,64

### 3.2.3.3. Yarı Katı NLC Formülasyonlarının Mekanik Özelliklerin Tayinine Ait Bulgular

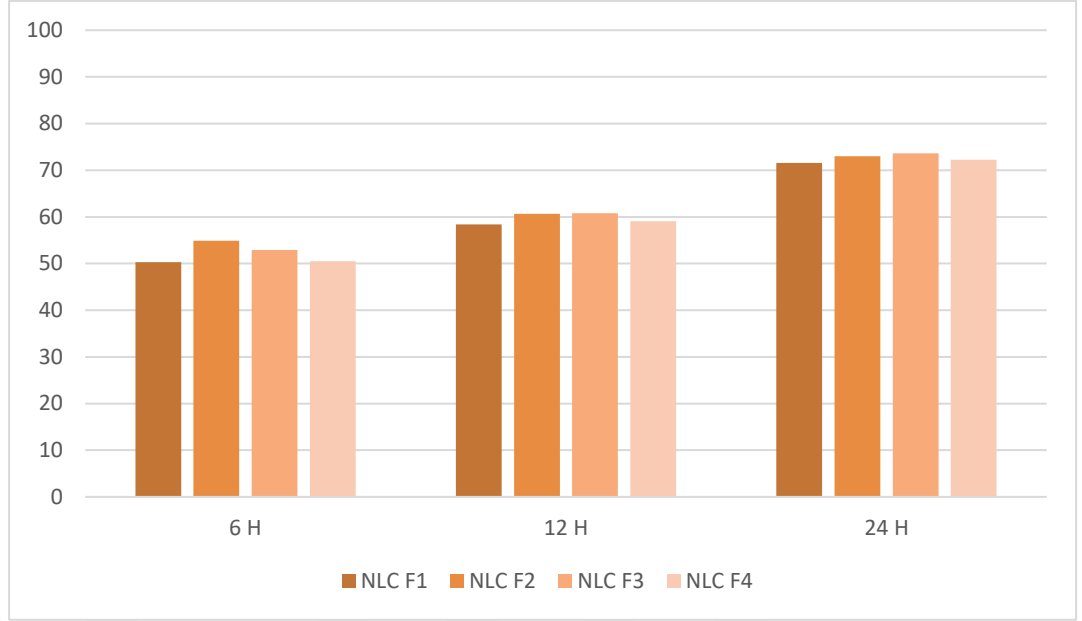
Hazırlanan yarı katı NLC formülasyonlarının mekanik özellikleri Bölüm 2.3.2.3.'de özetlendiği şekilde ölçülmüştür. Yarı katı NLC formülasyonların mekanik özelliklerine ait ilgili ölçüm sonuçları Çizelge 3.14'de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.14.** NLC formülasyonlarının mekanik özelliklerine ait bulgular (n=6)

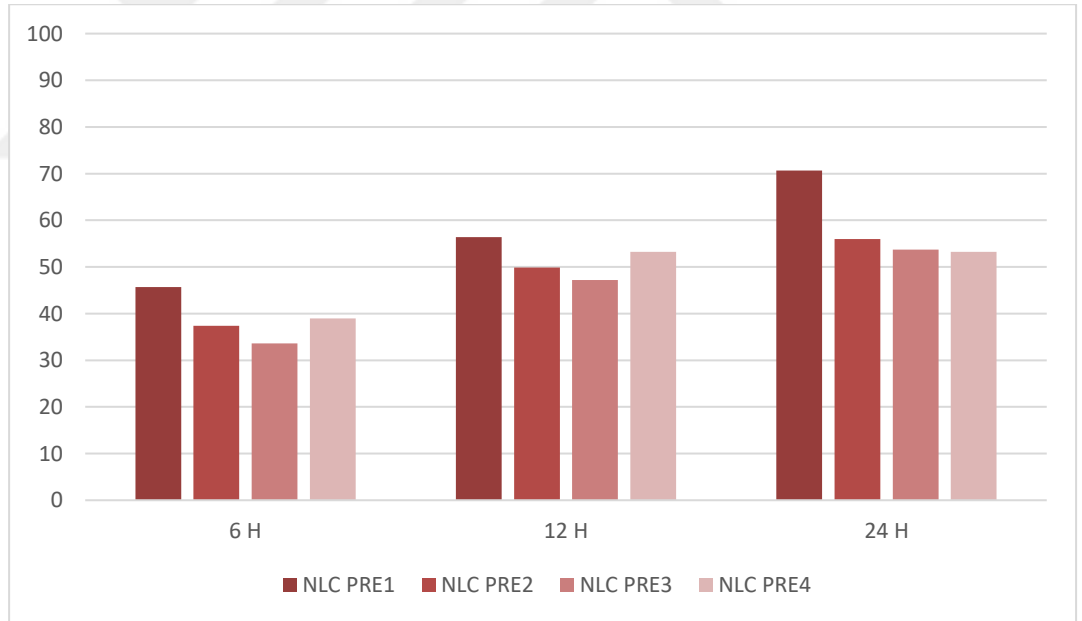
Formülasyon Kodu	Sertlik (N) ± SS	Sıkıştırılabilirlik (N.mm) ± SS	Adheziflik (N.mm) ± SS	Koheziflik ± SS	Elastikiyet ± SS
NLC F1	0,180±0,016	0,945±0,032	-0,010	1,045±0,070	1,011±0,005
NLC F2	4,023±0,408	19,513±4,367	-10,737±3,562	0,433±0,16	1,008±0,027
NLC F3	0,342±0,022	1,594±0,073	0,000	0,947±0,058	1,001±0,010
NLCF4	9,364±1,293	43,948±3,730	-8,632±1,672	0,594±0,078	0,983±0,029
NLC PRE1	1,920±0,190	6,071±1,153	-2,171±1,408	0,646±0,043	1,004±0,013
NLC PRE2	7,356±1,245	24,350±7,077	-7,487±1,314	0,531±0,098	0,988±0,028
NLC PRE3	1,403±0,320	4,544±1,092	-2,536±0,626	0,616±0,075	0,995±0,013
NLC PRE4	4,519±0,281	14,283±3,737	-5,616±1,470	0,475±0,069	0,998±0,010
NLC TP1	0,031±0,001	0,187±0,008	0,000	1,759±0,046	1,010±0,015
NLC TP2	0,036±0,002	0,159±0,009	0,000	1,22±0,25	1,007±0,02
NLC TP3	0,038±0,002	0,133±0,014	-0,016±0,01	0,876±0,138	1,017±0,006
NLC TP4	0,041±0,003	0,153±0,012	-0,012±0,004	0,919±0,051	1,016±0,018
NLC TS1	0,033±0,0020	0,182±0,008	0,000	1,698±0,072	1,004±0,023
NLC TS2	0,034±0,005	0,134±0,043	0,000	1,313±0,426	0,995±0,019
NLC TS3	0,036±0,002	0,175±0,010	0,000	1,541±0,155	1,005±0,023
NLC TS4	0,149±0,011	0,483±0,017	-0,318±0,016	0,865±0,016	1,005±0,010

### 3.2.3.1. Yarı Katı NLC Formülasyonlarına Ait *In Vitro* Oklüzyon Faktörünün Belirlenmesine Ait Bulgular

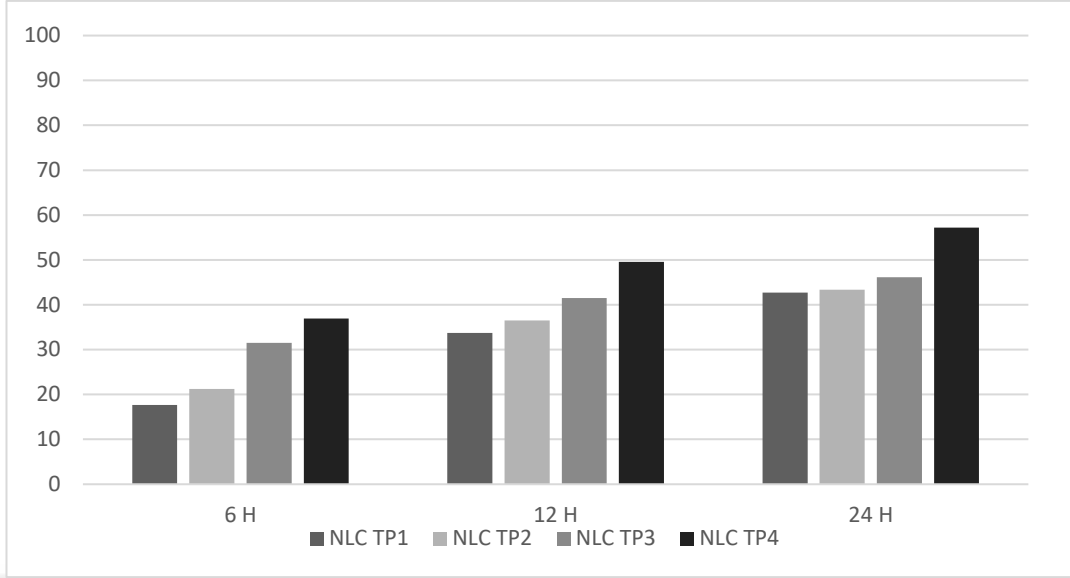
Hazırlanan yarı katı NLC formülasyonlarına *in vitro* oklüzyon testinin ne şekilde uygulandığı bölüm 2.3.2.4.'de anlatılmış sonuçlar Denklem 2.2.'ye göre hesaplanmıştır. Bu çerçevede hazırlanan yarı katı NLC'lerin 6, 12 ve 24. saatteki oklüzif özellikleri; katı lipid olarak Compritol 888 ATO içeren formülasyonlar için Şekil 3.6'de; Precirol ATO 5 içeren formülasyonlar için Şekil 3.7.'de; tripalmitin içeren formülasyonlar için Şekil 3.8.'de ve tristearin içeren formülasyonlar için Şekil 3.9'da grafikler halinde gösterilmiştir.



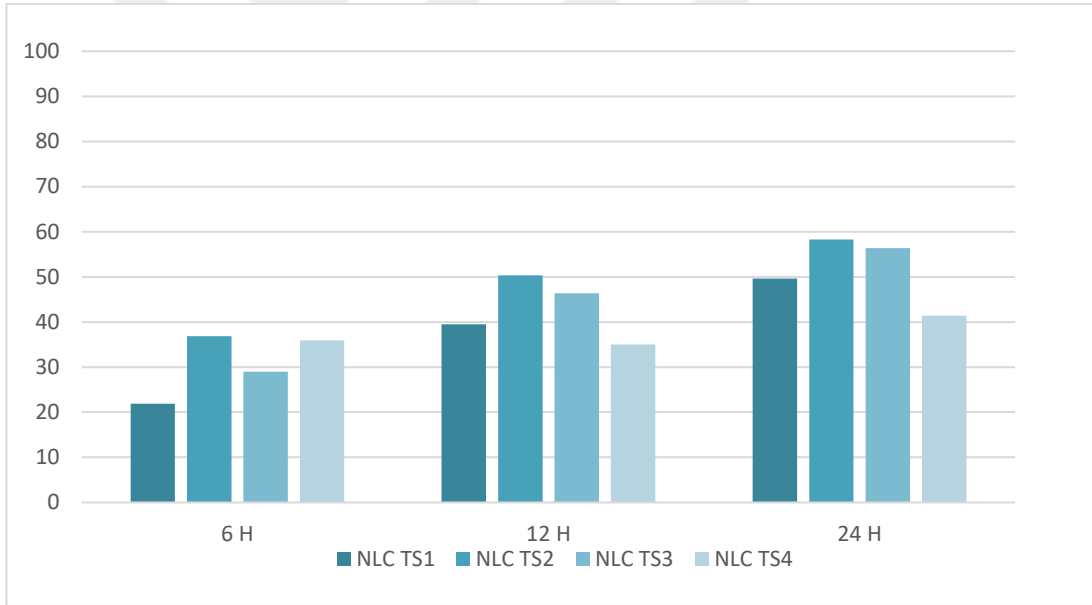
**Şekil 3.6.** Compritol 888 ATO içeren formülasyonlara ait 6, 12, 24. saat oklüzif özellikleri



**Şekil 3.7.** Precirol ATO 5 içeren formülasyonlara ait 6, 12, 24. saat oklüzif özellikleri.



**Şekil 3.8.** Tripalmitin içeren formülasyonlara ait 6, 12, 24. saat oklüzif özellikleri



**Şekil 3.9.** Tristearin içeren formülasyonlara ait 6, 12, 24. saat oklüzif özellikleri

### 3.3. Elde Edilen Verilerin Yapay Sinir Ağları ile Değerlendirilmesi ve Formülasyon Optimizasyonuna Ait Bulgular

Formülasyon çalışmalarında hazırlanan 16 farklı yarı katı NLC formülasyondan elde edilen girdi/çıkıktı verileri yapay sinir ağı modeli oluşturabilmek için Bölüm 2.4.'de anlatıldığı gibi programa aktarılmıştır. Elde edilen yapay sinir ağı modelinin güvenilirliğinin değerlendirildiği  $r^2$ 'li eğitim setleri elde edilmiştir. Girdi ve çıktılarla elde edilen ANN modeline ait  $r^2$  değerleri Çizelge 3.15'de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.15.** Model girdi/çıkıktı verilerinin YSA Programında değerlendirilmesi sonucu elde edilen modele ait  $r^2$  değerleri

MODEL	
ÇIKTILAR	$r^2$ değerleri
Partikül Boyutu	0,71
PDI	0,90
12.Saatteki Oklüzif Etki	0,86

Çalışmanın devamında elde edilen yapay sinir ağı modeli formülasyon optimizasyonu için kullanılmıştır. Elde edilen  $r^2$  değerlerine göre optimizasyonu aşamasında hazırlanan formülasyona ait bileşenler Çizelge 3.16'da gösterilmektedir.

**Çizelge 3.16.** YSA Programından Elde Edilen Optimum formülasyon bileşenleri.

Optimum Yarı Katı NLC Formülasyonu	
<i>Compritol 888 ATO (mg)</i>	0
<i>Precirol ATO 5(mg)</i>	2600
<i>Tripalmitin (mg)</i>	0
<i>Tristearin (mg)</i>	1650
<i>Argan yağı</i>	1400
<i>Kafein (mg)</i>	500
<i>Poloxamer 407 (mg)</i>	2500
<i>Dış Faz Hacmi (mL)</i>	25

### 3.4. Optimum Formülasyon Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular

#### 3.4.1. Optimum Formülasyonun Kritik Kalite Özelliklerine Ait Bulgular

Optimum formülasyon bileşenleri kullanılarak Bölüm 2.1.1.2.'de anlatıldığı şekilde yüksek hızda karıştırma ve ultrasonikasyon yöntemi ile optimum yarı katı NLC formülasyonu hazırlanmıştır. Bu formülasyona ait kritik kalite özellikleri olan partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve oklüzyon faktörü için ölçümlerle elde edilen değerler ve ürün kalitesine doğrudan etkisi olmadığı düşünülen 6., 12. ve 24. saate ait *in vitro* oklüzyon faktörü değerleri ile yüzde işlem etkinliği değerleri sonuçları Çizelge 3.17'de verilmiştir. Piyasadan temin edilen selülitin kozmetik bakımında kullanılan jel formülasyon da *in vitro* oklüzyon faktörünü optimum formülasyonla kıyaslama amacıyla tayin edilmiş ve oklüzyon faktörü değeri 6., 12. Ve 24. saatlerde "0" olarak bulunmuştur. Kritik kalite özellikleri için INform V5.01 ANN programı tarafından tahmin edilen analiz verileri de çizelgeye eklenmiştir. Optimum formülasyon ve piyasadan temin edilmiş olan selülitin kozmetik bakımında kullanılan üç farklı formülasyona ait mekanik özelliklere ait veriler de Çizelge 3.18'de görülmektedir.

**Çizelge 3.17.** Optimum formülasyona ait kritik kalite özellikleri ve programın önerdiği analiz verileri.

Parametreler	Kalite Özellikleri	Analiz verileri	ANN Programından gelen tahminler
Kritik Parametreler	Partikül boyutu	186,5±1,457	185
	PDI	0,208±0,033	0,207
	12. saat Oklüzyon Faktörü	46,5±5,6	40,1
Kritik olmayan Parametreler	Zeta Potansiyel	-26,6 ± 1,33	-
	6. saat Oklüzyon Faktörü	21,4±10,6	-
	24. saat Oklüzyon Faktörü	59,0±4,3	-
	%EE (Enkapsülasyon Etkinliği)	97,19±1,12	-



**Çizelge 3.18.** Optimum Formülasyonda mekanik özelliklere ait veriler (n=6).

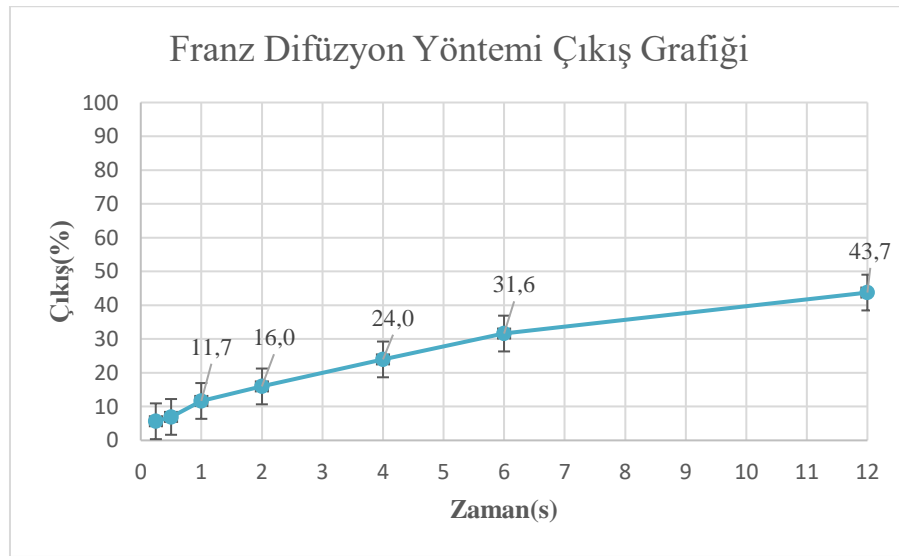
Formül	Sertlik (N) ± SS	Sıkıştırılabilirlik (N.mm) ± SS	Adheziyiklik (N.mm) ± SS	Koheziyiklik ± SS	Elastikiyet ± SS
Optimum Formül	0,039±0,001	0,190±0,005	0	1,493±0,046	0,997±0,007
Piyasa 1	0,059±0,002	0,204±0,023	0	0,893±0,030	0,997±0,013
Piyasa 2	0,125±0,002	0,403±0-019	0	0,953±0,010	0,993±0,0017
Piyasa 3	0,203±0,009	0,600±0,063	0,366±0,024	0,903±0,079	0,992±0,014

\*n=6

### 3.4.2. Optimum Formülasyon Üzerinde Yapılan *In-Vitro* Etkin Madde Salım Tayinine Ait Bulgular

#### 3.4.2.1. Franz Difüzyon Hücresi Yöntemi ile Yapılan Çalışmaya Ait Bulgular

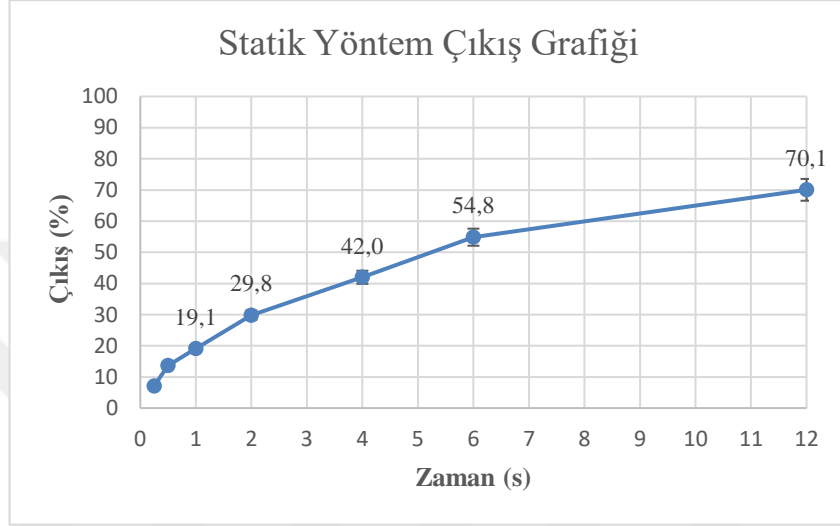
Franz Difüzyon Hücresi yöntemi ile salım çalışmalarının ne şekilde yapıldığı Bölüm 2.4.4.1.'de anlatılmıştır. Optimum formülasyona ait Franz Difüzyon Hücresi Yöntemi ile elde edilen salım profili Şekil 3.10.'da verilmiştir.



**Şekil 3.10.** Optimum formülasyona ait Franz Difüzyon Hücresi Yöntemi ile elde edilen salım profili.

### 3.4.2.2. Statik Yöntem ile Yapılan Çalışmaya Ait Bulgular

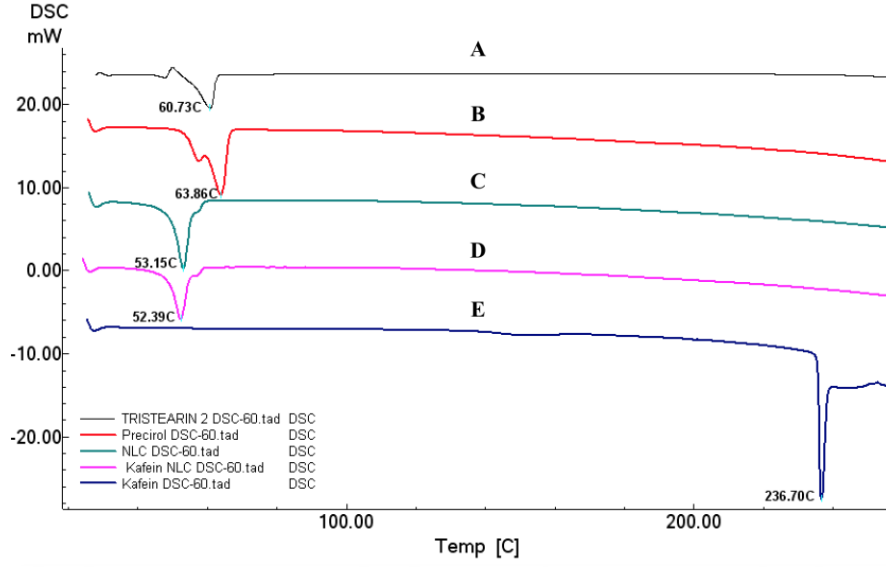
Statik Yöntem ile salım çalışmalarının ne şekilde yapıldığı Bölüm 2.4.4.2.'de anlatılmıştır. Optimum formülasyona ait statik yöntem ile elde edilen salım profili Şekil 3.11.'de verilmiştir.



Şekil 3.11. Optimum formülasyona Statik Yöntem ile elde edilen salım profili.

### 3.4.3. Optimum Formülasyon Üzerinde Yapılan Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC) Analizine Ait Bulgular

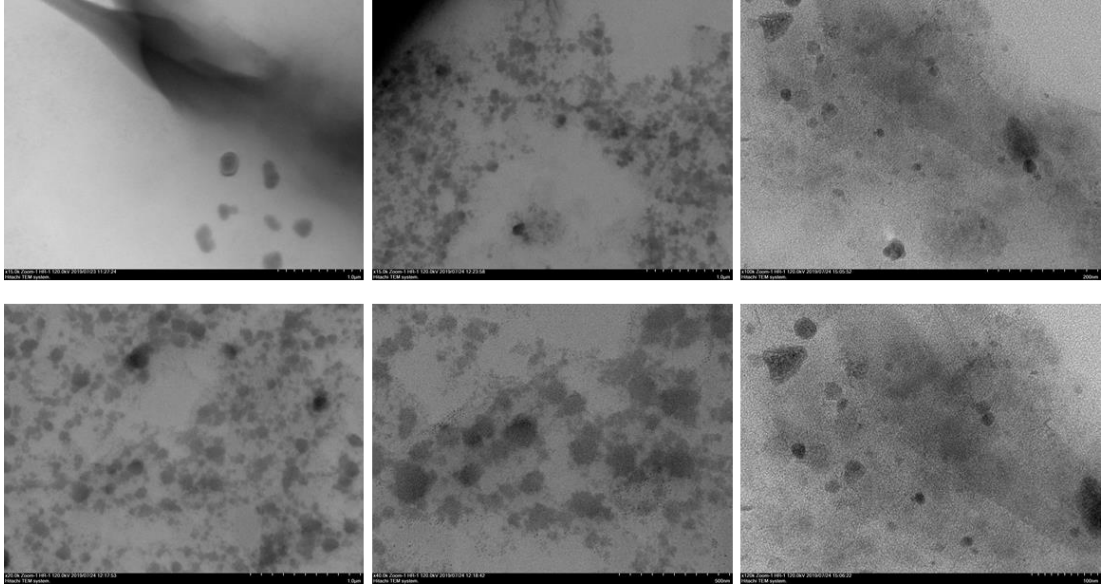
Üretiminde kullandığımız lipidlerden Precirol ATO 5 ve Tristearin'in, kafein eklenmemiş boş NLC'lerimizin ve kafein yüklü optimum NLC formülasyonunun diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) analizi Bölüm 2.4.5'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Elde edilen DSC termogramı Şekil 3.12'de görülmektedir.



**Şekil 3.12.** Tristearin (A), Precirol ATO 5 (B), Kafein eklenmemiş boş NLC (C), Optimum formülasyon (D), Kafein (E).

### 3.4.4. Optimum Formülasyon Üzerinde Yapılan Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) Analizine Ait Bulgular

Hazırlanan optimum yarı katı NLC formülasyonunda TEM analizi Bölüm 2.5.4.'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiş ve elde edilen TEM görüntüleri Şekil 3.13'de görülmektedir.



**Şekil 3.13.** Optimum yarı katı NLC formülasyonuna ait TEM mikrografı.

### 3.4.5. Optimum Formülasyonda Yapılan pH ve Viskozluk Ölçümlerine Ait Bulgular

Optimum formülasyonun pH ve viskozluk ölçümleri Bölüm 2.4.7’de bahsedildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Optimum formülasyona ait pH ve viskozluk verileri Çizelge 3.19’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.19. Optimum formülasyona ait pH ve vizkozluk ölçümü sonuçları

Formülasyon Adı	pH±SS*	Viskozite±SS** (CPS)		
		5 rpm	10rpm	20rpm
Optimum Formülasyon	6,62±0,006	(7±1,095)*10 <sup>3</sup>	(2,5±0,548) *10 <sup>3</sup>	(1,25±0,273)*10 <sup>3</sup>

\*(n=3) \*\*n=9

### 3.5. Stabilité Çalışmasına Ait Bulgular

Optimum formülasyon stabilitesinin değerlendirilmesi için Bölüm 2.4.9.’de anlatılan kontroller 1. Ayın sonunda tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.20’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.20. Optimum formülasyon stabilite çalışması başlangıç ve 1.ay bulguları

Stabilite	Yeplan Kontroller	Başlangıç	Birinci Ay
	Partikül boyutu* (nm)		186,533±1,457
PDI*		0,208±0,033	0,251±0,012
%EE**		95,99±2,01	93,62±3,66
pH*		6,62±0,006	6,51±0,006
Viskozite (CPS)	5 rpm**	(7,00±1,095)*10 <sup>3</sup>	(5,33±1,03)*10 <sup>3</sup>
	10 rpm**	(2,5±0,548) *10 <sup>3</sup>	(2,67±0,516) *10 <sup>3</sup>
	20 rpm**	(1,25±0,273)*10 <sup>3</sup>	(1,583±0,29)*10 <sup>3</sup>

\*n=3, \*\*n=6

## 4. TARTIŞMA

### 4.1. Kafein ile Yapılan Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Çalışmamızda model aktif bileşen olarak seçilen kafeinin metanol ve pH 7,4 PBS tamponundaki UV spektrumuna Bölüm 2.2.1’de anlatıldığı şekilde bakılmış, aktif bileşenin en yüksek absorbans gösterdiği dalga boyunun 273 nm olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonucun literatürle uyumlu olduğu bulunmuştur (S. S. Brown, 1986; Li ve ark., 1990).

Kafeinin karakterizasyonunun yapılabilmesi ve istenen saflıkta olduğunun kanıtlanabilmesi için DSC analizi yapılmıştır. Bölüm 2.2.2.’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen DSC analizi neticesinde 236,70C°’de saf haldeki kafeinin erime derecesine ait net bir endotermik pik saptanmıştır. Saptanan bu değer, referans değerler ile uyumlu olduğu belirlenmiştir (Puglia ve ark., 2016; Erol Eli Simsolo ve ark., 2018).

Kafeinin; metanol ve pH 7,4 PBS tamponu içindeki kalibrasyon doğruları belirlenmiş ve ulaşılan doğruların  $r^2$  değerlerinin 1’e yakın ( $r^2$ : 0,999) olduğu saptanmıştır. Bu katsayının 1’e yakın olması ve standart hataların küçük olması sebebiyle bulunan absorbanlardan hesaplanan konsantrasyonların güvenilir sınırlarda olduğu saptanmıştır.

Kafeinin miktar tayini yönteminin belirlenebilmesi için detaylı literatür taraması yapılmış ve miktar tayini yöntemi olarak UV Spektroskopisi yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir (Khazaeli ve ark., 2007; Erol Eli Simsolo ve ark., 2018). Miktar tayini yönteminin analitik validasyon çalışmaları kapsamlı olarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan analitik validasyonlar sonucunda, Bölüm 3.1.4.1-Bölüm 3.1.4.6’da gösterildiği gibi, yöntemin pH 7,4 PBS ve metanol ortamlarındaki doğrusalığı, doğruluğu, kesinliği ve seçicilik ispatlanmış ve her iki ortam için de teşhis ve tayin sınırları değerlendirilmiştir. Çizelge 3.1.’de görüldüğü gibi kafeinin bu miktar

taini yöntemleri için hesaplanan regresyon katsayılarının 1'e yakın olması her iki ortam için de yöntemin doğrusal olduğunu göstermiştir. Yöntemin doğruluk ve kesinlik çalışmaları sonuçları Çizelge 3.2. ve Çizelge 3.3.'de yer almaktadır. Her bir parametre için elde edilen bağıl sapmalar %2'nin altında bulunmuştur. Elde edilen düşük bağıl sağma değerleri yöntemin doğruluğunu ve kesinliğini ispatlamaktadır. Özgünlük çalışmaları sonucunda, formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddelerin 273 nm dalga boyunda herhangi bir pik vermediği ve dolayısıyla etkin madde ile bir girişim yapmadıkları gözlenmiştir. Bu sebeple yöntemin özgün olduğu belirlenmiştir. Kafeinin örnek içinde izlenebilecek en düşük analit miktarı (LOD) pH 7,4 fosfat tamponu ortamında 0,403 µg/ml metanol ortamında 0,278 µg/ml olarak bulunmuştur. Kafeinin kabul edilebilir kesinlik ve doğrulukla ölçülebilen en düşük analit konsantrasyonu (LOQ) ise pH 7,4 PBS ortamında 1,221 µg/ml metanol ortamında 0,841 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu sonuçlar kalibrasyon doğrusunu oluşturan en düşük konsantrasyon değerinin altında yer almaktadır. Miktar tayini yönteminin analitik validasyon çalışmaları sonucunda her iki ortam için de yöntemin kesinliği, doğruluğu, doğrusallık ve aralığı, özgünlüğü ispatlanmış, tayin ve teşhis sınırları belirlenmiştir.

Kafeinin 48 saatlik stabilitesi, Bölüm 2.2.4.6'da anlatıldığı şekilde tayin edilmiştir. Aktif bileşenin pH 7,4 fosfat tamponu ve metanol ortamındaki çözeltilerinin 37C° sıcaklıkta, 48 saat boyunca stabil olarak kalabildiği belirlenmiştir.

#### **4.2. Farmasötik Gelişim ve Tasarımla Kalite Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi**

Son yıllarda ilaç ve kozmetik ürünlerin kalite ve güvenliğinin kontrolü özellikle içerisinde nano yapıları aktif bileşik veya taşıyıcı sistem içeren sistemler için önemli bir konu oluşturmaktadır. Tasarımla kalite yaklaşımı ilk defa 2000 yılında FDA (Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından yeni üretilecek bir ilacın kalitesini ve güvenliğini değiştirebilecek tüm nedenleri belirlemek, analiz etmek ve kontrol etmek amacıyla önerilmiştir. 2008 yılında ICH tarafından ilk doküman olan

Farmasötikler için Teknik Gereklilikler Klavuzu oluşturulmuştur. Kaliteyi test eden geleneksel yaklaşımdan farklı olarak tasarımı kalite yaklaşımı kalite ve güvenliği dizayn aşamalarının ilk adımlarında inşa etmeyi amaçlamaktadır. Çalışmamızda selülitin kozmetik bakımında kullanılması amacıyla üretmeyi planladığımız yarı katı lipid nanopartiküllerimizi tasarımı kalite prensibiyle hazırlamak hedeflenmiştir.

QBD kapsamında ilk adım olan bilgi alanının oluşturulması amacıyla aktif bileşen ve yardımcı maddeler; üretim prosesleri hakkında incelenen literatürler ve toplanan bilgiler ışığında risk analizleri yapılmıştır. Yapılan ön formülasyon çalışmaları sonucunda bilgi alanı oluşturmuştur.

QbD, hedef ürününün kalite profilinin (QTPP) belirlenmesi ile yani tasarlanacak olan ürünün olası kalite özelliklerinin belirlenmesi ile devam eder. Bu istenen kalite ürünün sadece etkinliğini değil, güvenliğini de dikkate almaktadır.

Çalışmamızda selülitin kozmetik bakımında kullanılmak üzere yarı katı lipid nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması planlanmıştır. Kafein selülitin topikal bakımında etkisi bilinen fakat hidrofilik özellikte olmasından dolayı deri altında selülitte etki bölgesine penetrasyonu tartışmalı bir bileşiktir. Lipid nanopartiküllerin aktif bileşiklerin deriden penetrasyonunun arttırılması amacıyla kullanımı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Küchler,Abdel-Mottaleb ve ark., 2009; Küchler,Radowski ve ark., 2009; Schäfer-Korting ve ark., 2007). Selülit bakımında kullanılmak üzere geliştirilen konvansiyonel piyasa preparatlarına alternatif olabilecek bu formülasyonlar ile aktif bileşen olan kafeini; derinin selülit gelişen hipodermis tabakasına ulaştırabilecek özellikte, derinin yapısı ve pH'ı ile uyumlu olacak, deriye kolayca uygulanabilecek sürülebilme özelliklerine sahip ve uygulandığı bölgede oluşturacağı oklüzif etki ile etkinliğini arttıracak bir taşıyıcı sistemle vermek amaçlanmıştır. Bu amaçla hazırlanan formülasyonun yeniden bir taşıyıcı içerisinde yeniden formüle edilmesine gerek duyulmadan ve aktif bileşen kaybı olmadan verilmesine olanak sağlayan yarı katı lipid nanopartiküller taşıyıcı sistem olarak

seçilmiştir (Badıllı ve ark., 2015). Hedeflenen lipid nanopartiküllere ait hedef ürün kalite profili Çizelge 4.1’de gösterilmiştir

**Çizelge 4.1.** Yarı katı lipid nanopartiküllere ait hedef ürün kalite profili

<b>QTPP</b>	<b>Hedef</b>
<b>Uygulama yolu</b>	Dermal
<b>Uygulama için alternatif yöntem</b>	Yok
<b>Taşıyıcı sistem</b>	Yarı katı lipid nanopartikül
<b>Doz rejimi</b>	%2 a/a aktif bileşik içeren sistem
<b>Kozmesötik etki</b>	Selülinin kozmetik bakımı ve iyileştirilmesi
<b>Viskozite</b>	Geniş uygulama alanlarına yayılabilecek uygun viskozlukta
<b>pH</b>	Deri pH’sı ile uyumlu
<b>Salm profili</b>	Kontrollü aktif bileşik salımında
<b>Oklüzif etki</b>	Derinin hidrasyonunu sağlayacak en yüksek oklüzif etki
<b>Stabilite</b>	Oda sıcaklığında görünür bir faz ayrışması işareti olmayan ve stabilitesinoda sıcaklığında bir ay boyunca koruyan ürün

Kalite özellikleri ürünün beklenen kalitesinin sağlanması için belli bir aralıkta tutulması gereken fiziksel, kimyasal, biyolojik özellikler veya formülasyon ile ilgili herhangi başka bir karakteristik olabilir. Kalite özellikleri, oluşturulması planlanan ürün verimliliği ve kullanıcı güvenliği açısından kritikliklerine göre sıralanmalıdır. Hedeflenen ürün kalite profilini elde edebilmek için yarı katı lipid nanopartiküllerin; partikül boyutu, polidispersite indeksi ve oklüzyon faktörü değerleri kritik kalite özellikleri olarak belirlenmiştir. Söz konusu kritik kalite özellikleri Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.2.** Kalite özellikleri ve kafein içeren yarı katı lipid nanopartiküllerin kritik kalite özellikleri

<b>Kalite Özellikleri</b>	<b>Hedef</b>	
<b>Organoleptik özellikler</b>	Beyaz, kokusuz dispersiyon	Kritik değil
<b>Partikül boyutu</b>	150 – 250 nm aralığında olmalı	*Kritik
<b>Polidispersite indeksi</b>	0,3’ten küçük olmalı	*Kritik
<b>Zeta Potansiyeli</b>	-30 mV – 0mV aralığında olmalı	Kritik değil
<b>Oklüzyon faktörü</b>	%20’nin üstünde olmalı	*Kritik
<b>İşlem etkinliği</b>	Minimum %95	Kritik değil
<b>pH ve Viskozite</b>	Deri pH’sı ile uyumlu, geniş yüzey alanına uygulanabilir Viskozlukta	Kritik değil



Selülit ile ilgili kapsamlı literatür taramaları sonucunda topikal yolla selülitin kozmetik bakımında hedeflenen etkinin elde edilebilmesi için ortalama partikül boyutunun 250 nm ve altında olması gerektiği saptanmış bu nedenle çalışmada oluşturulması planlanan yarı katı lipid nanopartiküllerin partikül boyutları 150-250 nm aralığında seçilmiştir. Yapılan bir çalışmada, ortalama partikül boyutu  $182,6 \pm 8,4$  nm olan kafein yüklü SLN formülasyonlarının hidrojel oluşturulmuş ve bu formülasyonlar, kafein jeli formülasyonları ile *in vitro* permeasyon çalışmasında kıyaslanmıştır. SLN içerisine yüklenmiş kafein hidrojel formülasyonunun permeasyonunun kafein jel formülasyonuna kıyasla anlamlı şekilde hızlı olduğu ve 24 saatlik deney sonunda reseptör fazda biriken kafein miktarının da anlamlı oranda yüksek olduğu gösterilmiştir (Puglia ve ark., 2016). Bir başka çalışmada araştırmacılar kafeini SLN içerisine yüklemiş ve partikül boyutu 81 nm olan formülasyonu optimum formülasyon olarak belirlemişlerdir. Sıçan derisi ile Franz difüzyon hücresi yöntemi ile *in vitro* permeasyon çalışması yapılmış ve optimum kafein yüklü SLN formülasyonun hidrojel, kafein hidrojel ile kıyaslamıştır. 24 saat sonunda kafein hidrojelinden reseptör faza geçen aktif bileşen miktarı, kafein SLN hidrojeline kıyasla yüksek olduğunu saptamışlardır. Aynı çalışmada deride biriken kafein miktarları kıyaslanmış; kafein SLN hidrojel formülasyonu uygulanan deride biriken kafein miktarı (%12) kafein hidrojel uygulanan deriye (%0,75) kıyasla ciddi oranda yüksek olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar elde ettikleri bu sonuçlarla oluşturdukları kafein SLN hidrojelinin deride lokal etki oluşturan bir sistem elde ettiği şeklinde yorumlamışlardır (Hamishehkar ve ark., 2015). Nanopartiküllerin penetrasyonu sonucu oluşabilecek toksisite Dünya Sağlık Örgütü tarafından hala tartışmalı bir konu olarak kabul edilmektedir ve oluşabilecek etkiler tüm yönleriyle aydınlatılamamıştır. Nanopartikül yapı taşıyıcı sistemlerin oluşturma potansiyeli olan toksisite açısından partikül boyutu ve biyouyumlu olma faktörleri önem arz etmektedir. Nano yapı taşıyıcılar biyolojik engelleri aşarak vücuda küçük boyutlarından dolayı kolayca girebilirler. Vücudun içine girdikten sonra, boyutlarından dolayı hücre membranlarından kolayca geçebilirler ve normal hücresel işleyişin dengesini bozma potansiyeline sahip olan biyomoleküller ile kolayca etkileşime girebilirler. Partikül boyutu azaldıkça yüzey alanı büyüyecektir böylece partikülün yayıldığı yüzey

büyüyecektir. Daha büyük yüzey alanı, yüzeydeki atomlarının doymamış yüksek bir enerjiye sahip olma eğiliminde olmaları nedeniyle maddenin reaktivitesinin artmasına neden olur. Sonuç olarak nano taşıyıcılar ne kadar küçük partikül boyutuna sahip olurlarsa o kadar yüksek oksidatif strese neden olurlar ve uzun süreli toksisite riski artar (D. M. Brown ve ark., 2001; Singh ve ark., 2009). Ayrıca partikül boyutu 100 nm'den büyük moleküller hücreye sadece fagositoz ile alınabilir ve bu da ancak vücudun sınırlı bölgesindeki makrofajlar tarafından alınabildiği için toksisite riski daha azdır. 100 nm altındaki nanopartiküller ise endositoz ile tüm vücuttaki hücreler tarafından hücre içine alınabilir bu da yüksek toksisite riskine neden olmakta ve 100 nm'nin altındaki partiküller toksisite açısından yüksek riskli kabul edilmektedir. (Keck ve Müller, 2013) Bununla birlikte nanotoksikolojik sınıflandırma sistemine göre, molekülün vücut içinde parçalanabilirliğini ifade eden biyoyoumluluk toksisite açısından bir diğer önemli etmendir. Vücut içinde parçalanamayan moleküller parçalanabilen biyoyoumlu moleküllere göre yüksek toksisite riski taşırlar. Bu bilgiler doğrultusunda 100nm'nin üzerindeki ve biyoyoumlu nanopartiküller güvenli olarak değerlendirilmekte ve nanotoksikolojik sınıflandırma sistemine göre Sınıf I olarak tanımlanmaktadır (Müller ve ark., 2011). Hem bu çalışmalar hem de geliştirilen formülasyonun hedef bölgesinin deri altı yağ dokusu olması nedeniyle çalışmamızda ideal partikül boyutunun 150 nm-250 nm aralığında olması gerektiğine karar verilmiştir.

Polidispersite indeksi partikül büyüklüğü dağılımı aralığını ifade eder. PDI değeri küçük olan yani dar partikül dağılımı gösteren nanosistemlerin benzer boyuta sahip partiküllere sahip olduğu ve bu nedenle homojen olduğunu varsayılmaktadır. Aynı zamanda düşük PDI'ye sahip sistemlerin partikül agregasyonu riski az olduğundan stabilitelerinin daha iyi olduğu bilinmektedir. Pek çok çalışmada 0,5'in altında elde edilen PDI değerinin kabul edilebilir olduğunu bildirmektedir (Amasya ve ark., 2016; Shah ve ark., 2015). Bu çalışmada homojen bir partikül boyutu dağılımına sahip sistem elde edebilmek için polidispersite indeksi 0,3'ün altındaki formülasyonların elde edilmesi amaçlanmıştır.

Oklüzyon derinin üstünün bir bant, eldiven, geçirgen olmayan sargı veya transdermal cihazlarla kaplanmasını ifade eder. İçeriğinde katı yağlar veya polimer sıvı yağlar ihtiva eden topikal sıvağlar da deriden atmosfere suyun kaybını azaltarak söz konusu oklüzif etkiyi oluşturabilirler. Deri yüzeyinde oklüzif etki oluşması ile trans epidermal su kaybı azalır, *stratum corneum* tabakasında bulunan nem miktarı artar, epidermisteki korneositler içine suyu alarak şişer ayrıca deri tabakalarında kan akışı ve deri sıcaklığı yükselir böylece aktif bileşiğin derinin alt tabakalarına penetrasyonu artar (Cevc, 2004; Zhai ve Maibach, 2001). Bu oklüzif etkinliğin, nano boyutlu partiküler sistemlerde mikro boyutlu sistemlere oranla 15 kat daha yüksek olduğu araştırmacılar tarafından saptanmıştır (Wissing ve ark., 2001). Derideki oklüzif etki ile aktif bileşenin derinin alt katmanlarına penetrasyonunun en çok arttırılacağı sistemi oluşturmak hedeflenmiştir. Bu nedenle (%) yüzde oklüzif etki kritik kalite özelliği olarak tayin edilmiştir. Lipid nanopartiküler sistemlerin pek çok avantajından birisi de topikal uygulandıklarında deride bir film tabakası oluşturularak deriden su kaybını önlemeleri böylece derinin alt tabakalarına etkin madde geçişini arttırmalarıdır. Bu etki oklüzif etki olarak da adlandırılabilir. Oklüzyonun önemini ve derinin nemlenmesi ve bunun sonucunda penetrasyonun arttırılması ile ilgili lipid nanopartiküllerle pek çok çalışma yapılmıştır (Lombardi Borgia ve ark., 2005; Wissing ve ark., 2001). Çalışmamızda literatür verileri de dikkate alınarak oklüzif faktörün %20 ve üzerinde olması amaçlanmıştır.

Kritik materyal özellikleri kritik kalite özelliklerinin değişkenliğine etki eden formülasyon parametreleri ile ilgili verilerden oluşur. Kritik işlem parametreleri ise kritik kalite özelliklerinin değişkenliğini etkilemesi olası yarı katı lipid nanopartiküllerin üretim yöntemi parametrelerinden oluşmaktadır. Yarı katı lipid nanopartiküllerin formülasyonlarının oluşturulmasında kullanılacak olan katı lipid, sıvı lipid ve yüzey aktif maddeyi belirlemek için literatür taraması yapılmıştır. Bu tarama sonrasında SLN üretimi için en çok tercih edilen biyo-uyumlu katı lipidlerden farklı sınıflara ait olan 5 tanesi seçilmiştir. Katı lipid olarak trigliserit yapısındaki nötral lipidlerden tripalmitin (Dynasan 116), tristearin (Dynasan 118); gliseritlerin karışımlarından oluşan gliseril behenat (Compritol 888 ATO) ve gliseril palmiostearat (Precirol ATO 5) ve doymuş yağ asitleri grubundan da stearik asit kullanılmıştır. Sıvı

lipid olarak argan yağı ve oleik asit belirlenmiştir. Yüzey aktif maddelerin ve oranlarının seçiminde de literatür taraması yapılmıştır. Edinilen bilgiler sonucunda daha önceki çalışmalarda yarı katı lipid nanopartikül oluşturmada başarılı sonuçlar alınmış olan yüzey aktif maddelerden Poloxamer® 407 ve Poloxamer® 188 ile Tween® 80'in karışımının formülasyon tasarımında denenmesine karar verilmiştir (Abdel-Salam ve ark., 2017; Badilli ve ark., 2015).

Kafein yüklü yarı katı lipid nanopartiküllerinin hazırlanmasında yüksek basınçlı homojenizasyon ile yüksek hızda karıştırma ve ultrasonikasyon yöntemleri literatür taraması sonucunda elde edilen bilgiler ışığında ön formülasyonlarda denenmek amacıyla seçilmiştir. Seçilen yöntemler ile hazırlanacak lipid nanopartiküllerin partikül boyutu, polidispersite indeksi ve morfolojik olarak incelenen yapı özelliklerine katı lipid tipi ve oranı, yüzey aktif madde tipi ve oranı gibi parametrelerin etkisi araştırılıp uygun formül elde edilmeye çalışılmıştır. Bilgi alanına katkı sağlamak ve CPP ve CMA'ların belirlenmesi amacıyla oluşturulan ön formüllerin sürülebilirlik özellikleri morfolojik olarak incelenmiş ve partikül boyutları ile polidispersite indeksleri ölçülmüştür.

Ön formülasyon çalışmalarında ilk olarak seçilen yüksek basınçlı homojenizasyon yönteminin yarı katı lipid nanopartiküllerin hazırlanmasında tercih edilen bir yöntem olduğu literatür taraması sonucu anlaşılmıştır. Lippacher ve ark. (2001) bu yöntemle jel benzeri viskoelastik özelliklere sahip ve 150-300 nm partikül boyutlarına sahip yarı katı lipid nanopartiküller üretmişlerdir. Sonuç olarak tek basamaklı üretim metoduyla koloidal partikül boyutlarına sahip ve uygun viskoelastik özellikleri olan formüllerin oluşturulabileceği anlaşılmıştır.

İlk üretim için 3 farklı katı lipid ve YAM olarak Poloxamer 188 (%1,35) ve Tween 80 (%0,17) kullanılarak formülasyonlar Amasya ve arkadaşlarının kullandığı yüksek basınçlı homojenizasyon metodu modifiye edilerek hazırlanmıştır (Amasya ve ark., 2019). Bu yöntemle nanometre boyutlarında lipid partikül elde edilememiştir. Denenen F1-F9 kodlu tüm formülasyonların partikül boyutunun 1 µm üzerinde olduğu gözlenmiştir. Bu teknikle hedeflenen nano boyutta lipid nanopatikül formülasyonları

elde edilemediğinden yeni formülasyonların yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemiyle hazırlanmasına karar verilmiştir.

F. S. Abdel-Salam ve ark. (2017) kortizon türevi bir bileşik olan diflorokortalon valerat etken maddesini minimum sistemik absorpsiyon ile topikal uygulamak için hazırladıkları yarı katı lipid nanopartiküllerin formülasyon kompozisyonu ikinci grup lipid nanopartiküllerin hazırlanmasında denenmiştir. Yüksek Basınçlı Homojenizasyon metoduyla ilk grup formülasyonları katı lipid olarak Compritol 888 ATO, Precirol ATO 5, Tristearin ve Stearik Asit değişen konsantrasyonları ve YAM olarak Poloxamer 407'nin %10 konsantrasyonu denenmiştir. Oluşturulan F10-F17 kodlu formülasyonların partikül boyutları 122-167 nm aralığındadır, bununla beraber morfolojik özellikleri incelendiğinde en yüksek yağ konsantrasyonlarında dahi istenilen yarı katı akışkanlıkta bir formülasyon oluşmamıştır. Bu yöntemle üretimi yapılan söz konusu lipid nanopartiküllerin tümü akışkan sıvı kıvamdadır. Hedeflenen yarı katı lipid nanopartiküller iki formülasyonda da oluşturulamadığından dolayı yüksek basınçlı homojenizasyon tekniğinden vazgeçilmiştir.

Yarı katı lipid nanopartikül üretimi yapmak amacıyla pek çok araştırmacı ikinci üretim metodu olarak seçtiğimiz yüksek hızda karıştırma ve ultrasonikasyon yöntemini benimsemiştir. Bir grup araştırmacı yayımladıkları çalışmada etofenamat etken maddesi yüklü yarı katı SLN'ler elde etmek amacıyla yüksek hızda karıştırma ve ultrasonikasyon yöntemleri birlikte kullanmıştır. (Badilli ve ark., 2017) Araştırmacılar yaptıkları çalışma sonucunda uygun partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve jel benzeri yapıda sürülebilirlik özellikleri gösteren yarı katı SLN'ler elde etmişlerdir. Çalışmamızda yarı katı lipid nanopartiküller yüksek hızda karıştırma ve ultrasonikasyon yöntemiyle de Bölüm 3.2.1.2'de anlatıldığı şekilde hazırlanmış, S1-S12 kodlu formülasyonların yapısal özelliklerinin incelemesi ve karakterizasyonları yapılmıştır. Sonuçta elde edilen formüllerden nano boyutlarda ve uygun polidispersite indeksi aralığında olanlar saptanmıştır. Compritol 888 ATO, Precirol ATO 5 ve Tristearin katı yağları ile oluşturulan formülasyonların partikül boyutu, PDI verileri hedeflenen değerlere yakın çıkarken aynı konsantrasyonlarda stearik asit ile oluşturulan formüllerin partikül boyutlarının nanometre skalasında olmadığı

gözenmiştir. Aynı zamanda stearik asitli formüller çok sert ve mumsu bir yapıda olduklarından uygun bulunmamıştır. Bu nedenle yarı katı lipid nanopartiküllerin eldesinde stearik asitin kullanımından vazgeçilmiştir. Kullanılan diğer lipidler ile hazırlanan formüllerin bilgi alanı içerisinde yarı katı NLC formülasyonlarının hazırlanması amacıyla kullanılmasına karar verilmiştir. Sıvı lipid olarak doğal bir yağ olan argan yağı seçilmiştir. Argan yağı cilt nemlendirici, cilt bariyerini koruyucu, antioksidan ve yaşlanma etkilerini giderici özellikleriyle son yıllarda kozmetik açıdan dikkat çekmektedir. (Guillaume ve Charrouf, 2011). Aynı zamanda bu konuda literatürde argan yağı ile yapılan çalışmaların çok sınırlı olması nedeniyle çalışmamızda argan yağı sıvı lipid olarak tercih edilmiştir

Yapılan ön formülasyon çalışmaları sonucunda edinilen temel verilerle oluşturulan bilgi alanı doğrultusunda yarı katı lipid nanopartiküller hazırlanması aşamasına geçilmiştir. Formülasyonların hazırlanmasında yüksek hızda karıştırma ve ultrasonikasyon yöntemi kullanılmış ve yonteme ait kritik işlem parametreleri belirlenmiştir. Katı lipid olarak Compritol 888 ATO, Precirol ATO 5, tristearin ve tripalmitin, sıvı lipid olarak ise argan yağı seçilerek formülasyona ait parametreler yani kritik materyal özellikleri tayin edilmiştir. Yarı katı lipid nanopartiküller Poloxamer 407 kullanılarak stabilize edilmiştir. Buna göre formülasyon içindeki yüzde olarak farklı orandaki katı lipid/sıvı lipid karışımları (%20-%30), farklı katı lipid/sıvı lipid (70/30 - 80/20) oranlarıyla, sabit Poloxamer 407 oranı (%10) ve sabit aktif bileşik oranı (%2) kullanılarak 16 adet farklı yarı katı NLC formülasyonundan oluşan bir bilgi alanı elde edilmiştir.

Bu aşamada materyallerden veya prosten kaynaklı değişkenliğin kontrol edilebilmesi ve tanımlanmış hedef ürün kalite profiline ulaşabilmek için kontrol edilmesi gereken kritik kalite özellikleri için kontrol stratejisi geliştirmiştir. Kalite değişkenlerini ölçmek amacıyla lipid nanopartikül formülasyonlarının belirlenen kritik kalite özellikleri olarak belirlenen parametreler partikül boyutu ve polidispersite indeksi "Dinamik ışık saçınımı" yöntemi ile saptanmıştır. Oklüzyon faktörü ise in vitro oklüzyon testiyle ölçülmüştür (De Vringer, 1992). Kritik olmayan kalite

özelliklerinden ise zeta potansiyel tayinleri zetasizer ile yapılmış; mekanik özelliklerine bakılmış, miktar tayini, % işlem etkinlikleri hesaplanmıştır.

Hazırlanan formülasyonların partikül boyutu 163,1 nm -325,7 nm aralığındadır. PDI değerleri ise 0,161 – 0,477 aralığında bulunmuştur. Oluşturulan 16 yarı katı lipid nanopartiülün *in vitro* oklüzyon faktörleri Bölüm 3.3.2.4’de gösterildiği gibi 6,12 ve 24 saatler için ayrı ayrı hesaplanmıştır. 12. saat oklüzyon faktörü kritik kalite özelliği olarak seçilmiştir. Bunun nedeni geliştirilen formülasyonun günde iki defa uygulanmasının amaçlanmasıdır. 12. Saatte elde edilen *in vitro* yüzde oklüzyon faktörü değerleri %33,74 - %60,81 aralığında bulunmuştur. Elde edilen veriler amaçlanan sınırlar dahilinde olup tüm formüller için oklüzyon faktörü en az yüzde yirmidir.

Yarı katı bir ürün tasarlanırken ürünün ambalajından alınması, deri yüzeyine kolay uygulanması ve uygulandığı bölgede akmadan kalması açılarından belli mekanik özelliklere sahip olması istenir. Mekanik özelliklerin tayini bitmiş ürünün uygulamadaki başarısı hakkında ipuçları verir. Bu amaçla sertlik, sıkıştırılabilirlik, adheziflik, koheziflik ve elastikiyet özellikleri tayini Bölüm 2.3.2.3’de anlatıldığı şekilde yapılmış ve 16 formülasyona ait tekstür analiz sonuçları Çizelge 3.14’de gösterilmiştir. Mekanik ve reolojik özelliklere ürün kompozisyonu, içerdiği lipid cinsi, içerikteki lipid oranının önemli bir etkisinin olduğu oluşturulan 16 formülasyondan elde edilen farklı verileri sonucunda belirlenmiştir. Mekanik özelliklerden sertlik ve sıkıştırılabilirlik değerleri, ürünün üretimden bitiminde ambalaja koyulması, tüketici tarafından primer ambalajından alınması ve uygulandığı deri bölgesine yayılması açısından yorum yapılmasına imkan vermektedir. Bu değerlerin küçük olması özellikle selülit gibi büyük deri yüzeylerine uygulama yapılması açısından kolaylık sağlayacağı değerlendirilerek ürünün performansını arttıracığı kanaatine varılmıştır. Hazırlanan 16 formülasyon için Çizelge 3.14’de verilmiş olan oluşturulan 16 NLC formülasyonunun sertlik ve sıkıştırılabilirlik ölçüm sonuçları karşılaştırıldığında tüm formüllerin sürülebilme için uygun sertlik ve sıkıştırılabilirlik değerlerine sahip olduğu ve formülasyonlar içerisinde tripalmitin ve tristearin katı lipidleri ile üretilenlerin en düşük sertlik ve sıkıştırılabilirlik değerleriyle en kolay kaptan alma ve uygulama

özellikleri gösterebileceği değerlendirilmiştir. Koheziflik yarı katının uygulandıktan sonra oluşan yapısal reformasyonu ifade etmektedir. Koheziflik değeri yüksek olan formülasyonların uygulandıktan sonra yapılarını koruyabildiklerinin göstergesi olarak yorumlanmaktadır. Hazırlanan yarı katı NLC formülasyonlarının koheziflik değerleri literatürde yapılan çalışma sonuçları ve piyasa preparatlarının ölçüm sonuçlarına bakılarak uygun sınırlarda olduğu belirlenmiştir (Simsolo ve ark., 2018). Elastikiyet de koheziflik ile benzer olarak zamanla yarı katıda meydana gelen yapısal deformasyonun eski haline gelmesini ifade eder. Tüm formüllerin elastikiyeti 0,988 ile 1,011 arasında yakın değerler bulunmuştur.

#### **4.3. Elde Edilen Verilerin Yapay Sinir Ağları ile Değerlendirilmesi ve Formülasyon Optimizasyonu ile İlgili Bulguların Değerlendirilmesi**

QbD uygulamalarının veri analizi basamağı için yapay sinir ağı modeli oluşturmak amacıyla hazırlanan 16 farklı yarı katı NLC formülasyonuna ait kritik materyal özellikleri girdi olarak, formülasyonara ait kritik kalite özellikleri ise çıktı olarak kullanılmış, girdi ve çıktılar arasındaki ilişki INform V5.01 ANN programı kullanılarak incelenmiştir. Çalışmamızda yapay sinir ağı programı olan INform V5.01 ANN programının kullanılmasının sebebi, kalite özelliklerinin bilgisayar programı üzerinden değerlendirilmesi ve ulaşılması hedeflenen optimum formülasyonun daha kolay belirlenebilmesidir.

Bölüm 2.3.6.1.'de anlatıldığı gibi; INform V5.01 ANN programı ile yapay sinir ağı modeli oluşturabilmek için bilgi alanında yer alan girdi ve çıktılar programa aktarılmış, programın bu verilerle eğitilmesi ve öğrenmesi sağlanmış ve uygun bir yapay sinir ağı modeli geliştirilmiştir. Elde edilen bu modelin güvenilirliğinin değerlendirilmesinde  $r^2$ 'li eğitim setleri kullanılmıştır. Yorumlamalar aşağıda verilen aralıklarda ve  $r^2$  değerlerinin yüksek oluşuna göre yapılmaktadır. Modele ait  $r^2$  değerleri Çizelge 3.15'de verilmiştir. Çizelgede partikül boyutu, PDI, 12. Saatte elde edilen in vitroyüzde oklüzyon faktörü değerleri için  $r^2$  değerlerinin en düşük 0,71 ve en yüksek 0,90 arasında değişmekte olduğu görülmektedir. Buna göre çizelge 2.9'da



verilen girdi ve çıktılar kullanıldığında oluşturulan yapay sinir ağı modelinin güvenilir olduğu sonucuna varılmıştır.

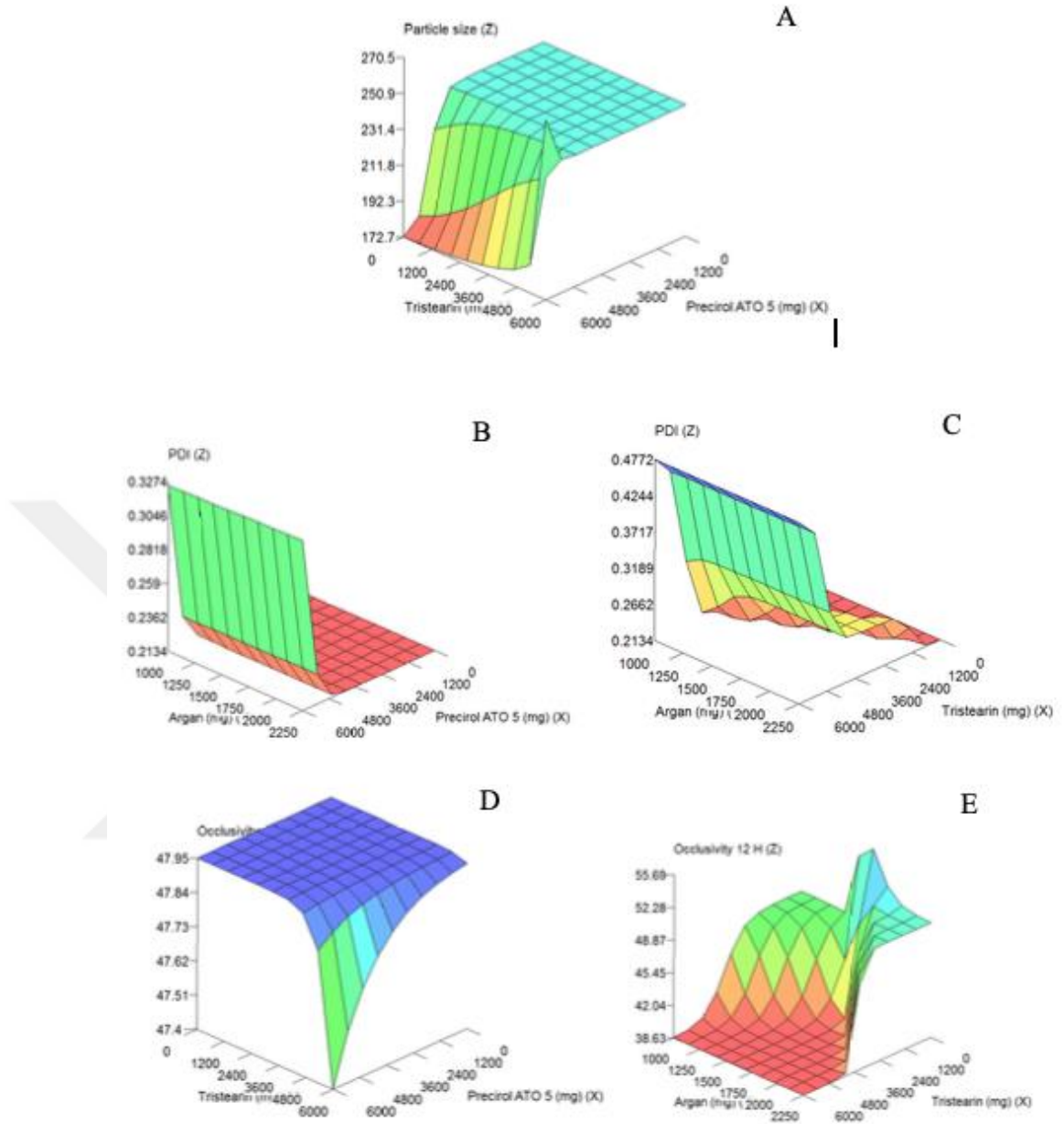
$r^2 \geq 0,70$	=	<b>Güvenilir model</b>
$0,50 \leq r^2 \leq 0,70$	=	<b>Dikkat edilmesi gereken model</b>
$r^2 \leq 0,50$	=	<b>Güvenilir olmayan model</b>

Elde edilen  $r^2$  değerlerine göre yapay sinir ağının verdiği optimum formülasyona ait bileşenler Çizelge 4.3’de gösterilmektedir.

**Çizelge 4.3.** YSA programından elde edilen optimum formülasyon bileşenleri

<b>Optimum Yarı Katı NLC Formülasyonu</b>	
<i>Compritol 888 ATO (mg)</i>	0
<i>Precirol ATO 5(mg)</i>	2600
<i>Tripalmitin (mg)</i>	0
<i>Tristearin (mg)</i>	1650
<i>Argan yağı</i>	1400
<i>Kafein (mg)</i>	500
<i>Poloxamer 407 (mg)</i>	2500
<i>Dış Faz Hacmi (mL)</i>	25

Şekil 4.1.’de model için elde edilen üç boyutlu grafiklerden örnekler verilmiştir. Buna göre, Şekil 4.1’de A) Precirol ATO 5 ve tristearinin partikül boyutuna olan etkisi B) Precirol ATO 5 ve argan yağının PDI üzerine etkisi; C) Tristearin ve argan yağının PDI üzerine etkisi D) Precirol ATO 5 ve tristearinin oklüzif özellik üzerine etkisi; E) Tristearin ve argan yağının oklüzif özellik üzerine etkisi grafiklerini içermektedir.



**Şekil 4.1.** INform V5.01 ANN programından elde edilen bazı üç boyutlu grafik örnekleri

Bu doğrultuda hazırladığımızda optimum formülasyondan analizler sonucu elde ettiğimiz kritik kalite özelliklerine ait veriler ve programdan gelen tahminler Çizelge 4.4’de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.4.** Optimum formülasyona ait YSA programından gelen tahminler ve analiz sonucu elde edilen veriler

Parametreler	Kritik Kalite Özellikleri	Analiz verileri	ANN Programından gelen tahminler
Kritik Parametreler	Partikül boyutu	186,5±1,457	185
	PDI	0,208±0,033	0,207
	12. saat Oklüzyon Faktörü	%46,5±5,6	40,1

Çizelge 4.4.'de de görüldüğü üzere programın tahmini verileri ve analiz sonucu elde ettiğimiz sonuçlar birbiriyle örtüşmektedir. Bu sonuçlar ile QbD temelli formülasyon optimizasyonunun başarıyla uygulandığına karar verilmiştir.

#### **4.4. Optimum Formülasyon Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi**

Optimum formülasyonun karakterizasyonu yapılmış, kritik kalite özellikleri ve bu özellikler ile istenilen hedef ürün kalite profiline ulaşıp ulaşılamadığı incelenmiştir. Hazırlanan optimum formülasyonun partikül boyutu 186,5±1,457 nm ve PDI değeri 0,208±0,033 olarak ölçülmüştür. Kritik kalite özelliklerinden oklüzyon faktörü ise %46,5±5,6 olarak bulunmuştur. Hazırladığımız optimum formülasyon ile çalışmamızın başlangıcında hedeflediğimiz kritik kalite özelliklerinin elde edildiği görülmüştür. Böylece yukarıda da belirtildiği gibi uygun bir QbD optimizasyonunun yapıldığı kanıtlanmıştır.

Aynı yöntemle ölçülen formülasyonun zeta potansiyel değeri  $-26,6 \pm 1,33$  olarak ölçülmüştür. Zeta potansiyel değeri yüksek oranda negatif veya pozitif olan sistemler kararlı kabul edilmektedir (Rahman ve ark., 2010). Bu açıdan oluşturulan yarı katı NLC formülasyonlarının sahip olduğu zeta potansiyel değerinin sistemin stabilitesi açısından olumlu olduğu düşünülmüştür.

Hazırlanan optimum yarı katı NLC formülasyonunun yüzde işlem etkinliği değeri  $97,19 \pm 1,12$  olarak hesaplanmıştır. Puglia ve arkadaşlarının çalışmasında da da benzer bir şekilde kafeini SLN içerisine yüklemiş ve hidrofilik aktif bileşenlerin, lipid nanopartiküllerde formülasyonu sırasında su fazında ayrılma eğilimi olduğundan dolayı zayıf bir şekilde enkapsüle olmasını beklerken yüksek işlem etkinliği ( $75\% \pm 1.1$ ) elde etmişlerdir. (Puglia ve ark., 2016) Yarı katı NLC formülasyonlar içerisine askorbil palmitat yüklenen başka bir çalışmada ise lipfilik maddenin  $100\%$ 'e yakın işlem etkinlikleri elde edilmiştir (Teeranachaideekul ve ark., 2008). Bu çalışmada kullanılan taşıyıcı sistemin yarı katı lipid nanopartikül olması nedeniyle  $100\%$ 'e yakın işlem etkinliği elde edilmiştir.

Oluşturulan optimum formülasyonun deri yüzeyinden suyun buharlaşarak uçmasının engellenmesinin ölçüldüğü oklüzyon faktörü ölçüm sonuçları Çizelge 3.17'de verilmiştir. Optimum formülasyon yüksek oranda ciltten suyun uzaklaşmasını azaltıcı bir oklüzif faktör değerine sahiptir. Bunun nedeni yarı katı NLC'nin içeriğindeki katı lipidlerin deri yüzeyindeki mikroporları tıkayarak bir film tabakası oluşturması böylece su kaybını engellenmesi olarak yorumlanabilir (Ammar ve ark., 2016). Optimum formülasyonun 6. Saatteki oklüzyon faktörü  $21,4 \pm 10,6$ , 12. Saatteki oklüzyon faktörü  $46,5 \pm 5,6$  ve 24. Saatteki oklüzyon faktörü  $59,0 \pm 4,3$  olarak hesaplanmıştır. Ayrıca optimum formülasyon ile kıyaslama yapmak amacıyla Piyasa1 koduyla belirtilen piyasa preparatı seçilmiş ve oklüzyon faktörü ölçülmüştür. Optimum formülasyonun 12. saatte  $46,5 \pm 5,6$  oklüzyon faktörüne karşılık piyasa preparatının oklüzyon faktörü 0 olarak bulunmuştur. Piyasa preparatına ait bu değer hiç preparat uygulanmamış kontrol deneyi ile aynı sonuç olması optimum formülasyonun piyasa preparatına göre çok daha üstün olduğunu göstermiştir.

Topikal uygulama amacıyla geliştirilen yarı katı preparatların kullanıcı tarafından uygulama kolaylığı bakımından mekanik özellikleri önem arz etmektedir. Hazırlanan formülasyonun konulduğu primer ambalajından kolay bir şekilde alınabilmesi, geniş uygulama alanlarına rahatlıkla sürülebilmesi topikal yarı katı preparatlarda aranılan mekanik özelliklerdir. Optimum formülasyonun ve piyasadan temin edilmiş olan selülitin kozmetik bakımında kullanılan üç farklı formülasyonun

mekanik özelliklerinden sertlik, sıkıştırılabilirlik, adeziflik, koheziflik ve elastikiyet değerleri ölçülmüş ve aralarında kıyaslama yapılmıştır. Sertlik ve sıkıştırılabilirlik değerleri formülasyonun primer ambalajdan alınmasının ve uygulama alanına sürülmesinin yorumlanmasında birlikte değerlendirilebilirler. Çizelge 4.5’de optimum formülasyon ve piyasada selülitin kozmetik bakımında kullanılan Piyasa 1, Piyasa 2 ve Piyasa 3 kodlu formülasyonların mekanik özelliklerine ait veriler gösterilmiştir.

**Çizelge 4.5.** Optimum formülasyon ve piyasa preparatlarının mekanik özelliklere ait veriler (n=6)

Formül	Sertlik (N) ± SS	Sıkıştırılabilirlik (N.mm) ± SS	Adheziflik (N.mm) ± SS	Koheziflik ± SS	Elastikiyet ± SS
<b>Optimum Formül</b>	0,039±0,001	0,190±0,005	0	1,493±0,046	0,997±0,007
<b>Piyasa 1</b>	0,059±0,002	0,204±0,023	0	0,893±0,030	0,997±0,013
<b>Piyasa 2</b>	0,125±0,002	0,403±0-019	0	0,953±0,010	0,993±0,0017
<b>Piyasa 3</b>	0,203±0,009	0,600±0,063	0,366±0,024	0,903±0,079	0,992±0,014

Çizelge 4.5’de verilen mekanik özelliklere ait verilere göre optimum formülasyonun sertlik ve sıkıştırılabilirlik değerlerinin piyasa preparatlarından düşük olması kaptan alınma ve kullanım alanına sürülebilme kolaylığı sağlayacağı düşünüldükçe uygun olduğu değerlendirilmiştir. Koheziflik yarı katının uygulandıktan sonra oluşan yapısal reformasyonu ifade etmektedir. Koheziflik değeri yüksek olan formülasyonların uygulandıktan sonra yapılarını koruyabildiklerinin göstergesi olarak yorumlanmaktadır. Hazırlanan optimum yarı katı NLC formülasyonunun koheziflik değerleri literatürde yapılan çalışma sonuçları ve piyasa preparatlarının ölçüm sonuçlarına bakılarak uygun sınırlarda olduğu belirlenmiştir (Simsolo ve ark., 2018). Elastikiyet de koheziflik ile benzer olarak zamanla yarı katıda meydana gelen yapısal deformasyonun eski haline gelmesini ifade eder. Tüm mekanik özelliklere ait değerler incelendiğinde optimum formülasyonunun topikal uygulama için uygun mekanik özelliklere sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Temel olarak, NLC'lerin oluşumunda üç farklı model olduğu teorisi ortaya atılmıştır. Bu modeller oluşturulurken katı çekirdek içindeki ilaç moleküllerinin yeri ve dağılımı arasındaki farklılıklar göz önünde bulundurulmuştur. NLC Tip 1 kusurlu kristal model olarak da anılır, NLC Tip 2 amorf model olarak da bilinmektedir ve NLC Tip III, çoklu model olarak tanımlanmıştır. Salım çalışmalarına baktığımızda hazırladığımız optimum formülasyonu NLC Tip 2 olarak yorumlayabiliriz. NLC Tip 2 belli lipid çeşitleri karışımı kullanıldığında oluşmaktadır. Amorf yapılı katı partiküller elde edilmesinden sorumlu olan bu lipidler, soğutma esnasında ve raf ömrü boyunca yeniden kristalizasyon oluşumundan kaçınırlar bu da depolama süresince aktif bileşiğin lipid nanopartikülden dışarı sızmasını en aza indirir. (Souto ve ark., 2007). Bizim çalışmamızda da katı lipid olarak Precirol ATO 5 ve tristearin yağları sıvı lipid olarak argan yağı ile karışımı olduğundan ve DSC ile bu optimum formülün amorf yapıda olduğu kanıtlandığından hazırlanan optimum yarı katı NLC formülasyonun NLC tip 2 modeline uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Yapılan *in vitro* salım çalışmalarında hem Franz Difüzyon Hücresi tekniği hem de statik yöntem kullanılmıştır. 1975'de Franz tarafından geliştirilen Franz difüzyon hücresi modeli salım çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir. Çalışmamızda reseptör kompartmana geçen aktif bileşik tayini önceden valide edilmiş olan PBS pH 7,4 ortamındaki etkin madde miktarı tayini ile gerçekleştirilmiştir. 12 saat sürdürülen deney sonucunda 12. Saatte açığa çıkan aktif bileşik miktarı %43,75 ±1,60 bulunmuştur.

Nano boyutlu ilaç salımını değerlendirmek için kullanılan yöntemler arasında, statik yöntem diğer adıyla diyaliz yöntemi Franz yöntemine alternatif olarak kullanılmaktadır. (D'Souza, 2014). Statik yöntemde aktif bileşik içeren nanopartiküller diyaliz membran içine koyulur ağzı sıkıca kapatılır ve reseptör içine yerleştirilir ve ortam sürekli olarak karıştırılır (Michalowski ve ark., 2004). Yarı katı lipid nanopartiküllerden kafeinin salımının 12 saat incelenmesi amacıyla ikinci yöntem olarak seçtiğimiz statik yöntemde 12. saatteki açığa çıkan kafein miktarı %70,05 ±2,63 olarak bulunmuştur.

Her iki yöntemde çıkan yüzde kafein miktarları karşılaştırıldığında doğal olarak statik yöntemde çıkan kafein miktarının çok daha fazla olduğu görülmektedir. Bunun nedeni statik yöntemde reseptör fazla temas eden diyaliz membran yüzey alanının Franz hücresine göre çok daha büyük olmasıdır. Statik yöntem ile çalışma sadece her iki yöntemin karşılaştırılması amacıyla yapılmıştır.

Kafein yüklü optimum formülasyon, kafein içermeyen optimum formülasyon ve bu formülasyon bileşiminde yer alan katı lipidlerinin DSC analizlerinden elde edilen termogram Şekil 3.12’de verilmiştir. Lipidlerden tristearinin erimesine bağlı olarak karakteristik endotermik pik 60,73 C°’de, Precirol ATO 5’in ise 63,86 C°’de gözlenmiştir. Saf lipitlere ait bu pikler, kafein içeren ve kafein içermeyen optimum formülasyonun DSC termogramlarında yaklaşık 8-10 derecelik kaymalarla birlikte gözlenmiştir. Lipidler bir araya geldiğinde erime noktasında görülen azalma, iki lipidin kısmi etkileşimlerine ve ikili lipit matrisinin kristallikteki değişime bağlanabilir. Benzer bulgular lipid karışımlarından lipid nanopartikül üreten farklı araştırmacılar tarafından da gözlenmiştir (Amasya ve ark., 2019; Chantaburana ve ark., 2017). Saf haldeki kafein 236,7 C°’de keskin bir endotermik pik vermiştir. Kafein yüklü optimum formülasyonda ise aktif bileşene ait erime pikinin gözlenmemesi kafeinin lipid matrisi içerisinde amorf halde bulunduğunu göstermektedir.

Optimum formülasyonun geçimli elektron mikroskobu ile görüntülenmesi yapılmış ve oluşturulan yarı katı NLC’lerin koloidal boyutta ve küresel şekilli partiküller elde edildiği gözlenmiştir. NLC formülasyonlarında herhangi bir agregasyon oluşmadığı gözlemlenmiştir.

Dermal formülasyonların pH’ı deride tahrişe, irritasyona ve cildin bakteriyel enfeksiyona açık hale gelmesine neden olmaması açısından önemli bir faktördür (Clares ve ark., 2014). Hazırlanan optimum formülasyonun pH ve viskozite ölçüm sonuçları Çizelge 3.19’da verilmiştir. Formülasyon pH’sı  $6,62 \pm 0,006$ ’dir. Derinin doğal pH’sı, vücudun hangi bölgesinde yer aldığına ve bireyin yaşına bağlı olarak 4 ila 6 arasında değişmektedir (Loden, 2003). Bu bilgiler dahilinde oluşturulan formülasyonun topikal uygulama için uygun pH’ya sahip olduğu olduğuna karar

verilmiştir. Bir formülasyonun reolojik karakteri özellikle paketinden ürünü alma ve cilt üzerinde uygulayabilme, yayabilme özelliklerine etkisi bakımından önemlidir (Alves ve ark., 2011). Optimum formülasyon reolojik olarak incelenmiş ve üç farklı hızda viskozluk değerleri ölçülmüştür. Ölçülen bu değerler sonucunda formülasyonun viskozluğunun kayma hızı arttıkça azalan pseudo plastik akış tipine sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Alves ve ark., 2011). Pseudo plastik akış gösteren yarı katı formülasyonlar topikal uygulamaya en uygun formlardır. Bir çalışmada minoksidil etkin maddesi içeren NLC formülasyonları su içinde yağ (Y/S) tipi emülsiyon içerisinde formüle edilmiş ve reolojik özellikleri incelenmiştir. Oluşturulan formüllerin pseudo plastik akış tipine sahip ve tiksotropik özellikleri olduğu ve bu akış tipinin topikal uygulama için elverişli olduğu sonucuna varılmıştır (Silva ve ark., 2009). Bizim formülasyonumuz da bu açıdan uygun özelliklere sahiptir.

Optimum formülasyonun  $25 \pm 1$  C°, % 60 bağıl nem koşullarında, birinci ay stabilite sonuçları incelendiğinde kritik kalite özelliklerinden partikül boyutu ve polidispersite indeksi değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ( $p>0,05$ ). Enkapsülasyon etkinliğinde de bir aylık sürede istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olmamıştır ( $p>0,05$ ). Başlangıç ve birinci ay pH değerleri yakın olmasına ve iki değer de deriye uygulanmaya uygun pH aralığında olmasına rağmen ölçümler arasındaki standart sapmanın çok küçük olmasından dolayı aralarında bir fark olduğu yönünde bir istatistiksel veri olsa da pH'daki değişimin önemli olmadığı değerlendirilmiştir. Formülasyonların viskoziteleri başlangıçta 5rpm, 10rpm ve 20 rpm hızlarda akış tipinin belirlenmesi amacıyla ölçülmüştür. Stabilite çalışmalarında 10 rpm'deki viskozluk değerinin kullanılmasına karar verilmiştir. Bu dönü hızında başlangıç ve birinci ay viskozluk ölçüm sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ( $p>0,05$ ). Bu sonuçlar oluşturulan optimum formülasyonun fizikokimyasal olarak bir aylık dönemde stabil kaldığını göstermiştir. Stabilite çalışmaları devam etmektedir.



## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında selülitin kozmetik bakımında kullanılmak üzere tasarımıla kalite prensibi benimsenerek yarı katı lipid nanopartikül formülasyonu hazırlanmış ve aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

1. Projede kullanılan etkin madde olan kafeinin miktar tayininin yapılabilmesi için farklı ortamlarda hassas ve güvenilir bir miktar tayini yöntemi belirlenmiştir. Aynı zamanda miktar tayini yönteminin analitik validasyon çalışmaları yapılmıştır.

2. Selülit için etkili olan kozmesötik maddenin derideki hedef bölgeye taşınabilmesi için nanoteknolojiden yararlanılmış ve dermal yolla kullanımı avantajlı olduğu bilinen aynı zamanda bitmiş ürün olarak değerlendirilen yarı katı NLC sistemleri taşıyıcı sistem olarak seçilmiştir.

3. Formülasyonların hazırlanmasında ve geliştirilmesinde QbD yaklaşımı benimsenmiş ve belirlenen hedef ürün kalite profiline ulaşabilmek için gerekli kritik kalite özellikleri oluşturulan bilgi alanı içerisinde benimsenmiştir.

4. QbD adımları takip edilerek yapılan çalışmada ön formülasyon çalışmaları yapılarak kritik işlem parametreleri ve kritik materyal özellikleri belirlenmiş ve formülasyon çalışmalarına geçilmiştir.

5. Hedef ürün kalite profilini sağlayan optimum formülasyona INForm V5.01 ANN programı ile ulaşılmış ve yarı katı lipid nanopartikül formülasyon optimizasyonu yapay sinir ağları yardımıyla yapılmıştır.

6. Elde edilen optimum formülasyon kritik kalite özellikleri incelendiğinde QbD kapsamında başta belirlenen özelliklere ulaşıldığı görülmüş ve kozmetik alanda başarılı bir QbD çalışması yapılmıştır.

7. Sonuç olarak tamamlanan bu çalışmada nanoteknoloji, tasarımla kalite ve yapay zeka gibi ileri teknolojiler bir arada kullanılarak zaman ve maliyetten tasarruf etmeyi sağlayan, kalitenin baştan belirlendiği bir ürün elde edilmiştir.

8. Çalışmanın devamında geliştirilen sonuç formülasyonunun uzun süreli stabilite çalışmaları; *in vivo* etkinlik testlerinin yapılması ve piyasadaki benzer ürünlere alternatif olarak değerlendirilmesi önerilmektedir.



## ÖZET

### **Selülitin Kozmetik Bakımında Lipid Nanopartiküler Sistemlerin Geliştirilmesine Yönelik Çalışmalar**

Sıklıkla kadınlarda östrojen etkisine bağlı yağ dağılımının belirgin olduğu pelvik bölge, alt ekstremiteler ve abdominal bölgede gözlenen ve tipik portakal kabuğu görünümüne yol açan selülit bir hastalık olmamakla beraber estetik bir problemdir. Selülitin kozmetik bakımında özellikle metil ksantin içeren ürünler cilt altına aşırı yağ birikimini önlemesi ve lenfatik drenajı artırması nedeniyle tercih edilmektedir. Metil ksantinler içinde de en çok kullanılan kafein, çalışmada aktif bileşen olarak seçilmiştir. Nano yapıli lipid taşıyıcılar topikal ilaç ve kozmetiklerde son yıllarda üzerinde pek çok çalışma yapılan sistemlerdir. Bu sistemler yeni nesil kozmetik ürünlerde oklüzif etkisiyle deriyi nemlendirmesi, *stratum corneum* tabakasından etkin madde penetrasyonunu artırması ve epidermis veya dermisin belli bölgelerine hedeflendirme yapabilmesi gibi avantajlarından dolayı tercih edilmektedir. Bu sistemler içerisinde yer alan yarı katı lipid nanopartiküllerin en önemli avantajı ise yeniden formüle edilmelerine gerek kalmadan kullanılabilmesi yani bitmiş ürün olarak değerlendirilmeleridir. Bu çalışmada kafein içeren yarı katı lipid nanopartiküller ICH Q8 klavuzunda yer alan tasarımla kalite yaklaşımı benimsenerek geliştirilmiştir. Hedef ürün kalite profili belirlenerek, buna ulaşabilmek için gerekli kritik kalite özellikleri; partikül büyüklüğü, PDI ve oklüzyon faktörü olarak tayin edilmiştir. QbD kapsamında veri analizi ve formülasyon optimizasyonu yapay zeka araçları yardımıyla yapılmıştır. Formülasyon çalışmaları sonuçlarına göre geliştirilen yapay sinir ağı modeli yardımıyla elde edilen optimum formülasyon hedef ürün kalite profiline ulaşabilmek için gerekli kalite özelliklerine sahip olduğu bulunmuş ve selülitin kozmetik olarak bakımı için nanoteknoloji, tasarımla kalite ve yapay zekanın bir arada kullanılmasıyla elde edilen bir final ürün elde edilmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Kafein, Nano Yapılı Lipid Taşıyıcı Sistemler, Selülit, Tasarımla Kalite, Yapay Sinir Ağları.

## SUMMARY

### **Studies on Development of Lipid Nanoparticulate Systems For Cosmetic Care of Cellulites**

Cellulite is frequently observed in the pelvic region, lower extremities and abdominal region where fat distribution is significant due to estrogen effect in women. Cellulite that leads to a typical orange-peel syndrome is not an illness but an aesthetic problem. Frequently methyl xanthine containing products are preferred in topical treatment of cellulite. Because they prevent excessive fat accumulation under the skin and increase lymphatic drainage. Caffeine, which is the most widely used methyl xanthine, was selected as an active ingredient for our study. Nowadays, lipid based nanocarriers have been the subject of many studies on topical drug delivery and also cosmetics. These systems are preferred in new generation cosmetic products because of their advantages such as enhancing the hydration of the skin with occlusive effect, improving the penetration of active substance from the stratum corneum layer and targeting the active substance to the epidermis or dermis. The most important advantage of the semi solid lipid nanoparticles in these systems is that they can be used without having to be reformulated, due to that they are considered as final products. In this study, semi solid lipid nanoparticles containing caffeine were developed by adopting quality approach with the design in ICH Q8 manual. The critical quality properties required to achieve the target product quality profile were determined as particle size, PDI and occlusion factor. According to the results of the formulation studies, it has been found that the optimum formulation obtained with the help of artificial neural network model has the required quality characteristics in order to reach the target product quality profile and for the cosmetic care of cellulite, a final product was obtained by combining nanotechnology, quality by design and artificial intelligence.

**Key Words:** Artificial Neural Networks, Caffeine, Cellulite, Nanostructured Lipid Carrier Systems, Quality by Design.

## KAYNAKLAR

- ABDEL-SALAM FS, MAHMOUD AA, AMMAR HO, ELKHESHEN SA (2017). Nanostructured lipid carriers as semisolid topical delivery formulations for diflucortolone valerate. *J Liposome Res*, **27(1)**: 41-55. doi:10.3109/08982104.2016.1149866
- ABDEL-SALAM FS, MAHMOUD AA, AMMAR HO, ELKHESHEN SA (2017). Nanostructured lipid carriers as semisolid topical delivery formulations for diflucortolone valerate. *J Liposome Res*, **27(1)**: 41-55.
- ADDOR FASA (2017). Antioxidants in dermatology. *Anais brasileiros de dermatologia*, **92(3)**: 356-362. doi:10.1590/abd1806-4841.20175697
- AGATONOVIC-KUSTRIN S, BERESFORD R (2000). Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **22(5)**: 717-727. doi:[https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(99\)00272-1](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(99)00272-1)
- AKBARZADEH A, REZAEI-SADABADY R, DAVARAN S, JOO SW, ZARGHAMI N, HANIFEHPOUR Y, SAMIEI M, KOUHI M, NEJATI-KOSHKI K (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, **8(1)**: 102. doi:10.1186/1556-276X-8-102
- AKSU B. (2010). *Ramipril Tablet Üretim İşleminde Yenilikçi Farmasötik Üretim Uygulamaları*. (Doktora), Ege Üniversitesi İzmir.
- AKSU B, DE BEER T, FOLESTAD S, KETOLAINEN J, LINDEN H, LOPES JA, DE MATAS M, OOSTRA W, RANTANEN J, WEIMER M (2012). Strategic funding priorities in the pharmaceutical sciences allied to Quality by Design (QbD) and Process Analytical Technology (PAT). *Eur J Pharm Sci*, **47(2)**: 402-405. doi:10.1016/j.ejps.2012.06.009
- AKSU B, PARADKAR A, DE MATAS M, OZER O, GUNERI T, YORK P (2013). A quality by design approach using artificial intelligence techniques to control the critical quality attributes of ramipril tablets manufactured by wet granulation. *Pharm Dev Technol*, **18(1)**: 236-245. doi:10.3109/10837450.2012.705294
- ALVES MP, RAFFIN RP, S.B. F. (2011). Rheological Properties of Semisolid Formulations Containing Nanostructured Systems. In: *Nanocosmetics and Nanomedicines: New Approaches for Skin Care* Ed.: Beck, R., Guterres, S., Pohlmann, A., Berlin: Springer. 37-46.
- AMASYA G, AKSU B, BADILLI U, ONAY-BESIKCI A, TARIMCI N (2019). QbD guided early pharmaceutical development study: Production of lipid nanoparticles by high pressure homogenization for skin cancer treatment. *Int J Pharm*, **563**: 110-121. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.03.056>
- AMASYA G, BADILLI U, AKSU B, TARIMCI N (2016). Quality by design case study 1: Design of 5-fluorouracil loaded lipid nanoparticles by the W/O/W double emulsion - Solvent evaporation method. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **84**. doi:10.1016/j.ejps.2016.01.003
- AMMAR HO, GHORAB MM, MOSTAFA DM, IBRAHIM ES (2016). Folic acid loaded lipid nanocarriers with promoted skin antiaging and antioxidant efficacy. *Journal of drug delivery science and technology*, **31**: 72-82.

- ANDO H, MATSUI MS, ICHIHASHI M (2010). Quasi-Drugs Developed in Japan for the Prevention or Treatment of Hyperpigmentary Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, **11(6)**: 2566-2575. doi:10.3390/ijms11062566
- AVRAM MM (2004). Cellulite: a review of its physiology and treatment. *J Cosmet Laser Ther*, **6(4)**: 181-185. doi:10.1080/14764170410003057
- BADILLI U, SENDEL TURK TC, TARIMCI N. (2015). Novel Dosage Forms: Semisolid SLNs. In: *A novel approach for topical delivery of SLNs: Semisolid SLNs* Ed.: Tarimci, N., Sengel Turk, T. C., Badilli, U.: Lambert Academic Publishing.
- BADILLI U, SENDEL-TURK CT, AMASYA G, TARIMCI N (2017). Novel Drug Delivery System for Dermal Uptake of Etofenamate: Semisolid SLN Dispersion. *Curr Drug Deliv*, **14(3)**: 386-393. doi:10.2174/1567201813666160808110245
- BADILLI U, TARIMCI N. (2016). Dermokozmetik/Kozmesötik Etkin Maddeler-I. (Ed.: Yazan, Y.). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi.
- BADILLI U, TUBA SENDEL-TURK C, ONAY-BESIKCI A, TARIMCI N (2015). Development of etofenamate-loaded semisolid sln dispersions and evaluation of anti-inflammatory activity for topical application. *Curr Drug Deliv*, **12(2)**: 200-209.
- BALFAGÓN A, SERRANO-HERNANZ A, TEIXIDÓ J, TEJEDOR-ESTRADA R (2010). Comparative study of neural networks and least mean square algorithm applied to the optimization of cosmetic formulations. *Int J Cosmet Sci*, **32**. doi:10.1111/j.1468-2494.2009.00565.x
- BARRY BW (2001). Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Sci*, **14(2)**: 101-114.
- BASTOGNE T (2017). Quality-by-design of nanopharmaceuticals - a state of the art. *Nanomedicine*, **13(7)**: 2151-2157. doi:10.1016/j.nano.2017.05.014
- BROWN DM, WILSON MR, MACNEE W, STONE V, DONALDSON K (2001). Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol*, **175(3)**: 191-199. doi:10.1006/taap.2001.9240
- BROWN SS (1986). Clarke's Isolation and Identification of Drugs. *Journal of Clinical Pathology*, **39(12)**: 1368-1368.
- CEVC G (2004). Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Adv Drug Deliv Rev*, **56(5)**: 675-711. doi:10.1016/j.addr.2003.10.028
- CHANTABURANAN T, TEERANACHAIDEEKUL V, CHANTASART D, JINTAPATTANAKIT A, JUNYAPRASERT VB (2017). Effect of binary solid lipid matrix of wax and triglyceride on lipid crystallinity, drug-lipid interaction and drug release of ibuprofen-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for dermal delivery. *J Colloid Interface Sci*, **504**: 247-256. doi:10.1016/j.jcis.2017.05.038
- CLARES B, CALPENA AC, PARRA A, ABREGO G, ALVARADO H, FANGUEIRO JF, SOUTO EB (2014). Nanoemulsions (NEs), liposomes (LPs) and solid lipid nanoparticles (SLNs) for retinyl palmitate: Effect on skin permeation. *Int J Pharm*, **473(1)**: 591-598. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.08.001>

- CONNAY A, LU Y-P, LOU Y-R, KAWASUMI M, NGHIEM P (2013). Mechanisms of Caffeine-Induced Inhibition of UVB Carcinogenesis. *Frontiers in Oncology*, **3(144)**. doi:10.3389/fonc.2013.00144
- COSTA R, SANTOS L (2017). Delivery systems for cosmetics - From manufacturing to the skin of natural antioxidants. *Powder Technology*, **322**: 402-416. doi:<https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.07.086>
- D'SOUZA S (2014). A review of in vitro drug release test methods for nano-sized dosage forms. *Advances in Pharmaceutics*, **2014**.
- DE VRINGER T. (1992). Patent, E.
- DI SALVO R.M. (1995). Controlling the Appearance of Cellulite *Cosmetics and Toiletries*, **110: 50-60**.
- DEĞİM T. (2007). Deriden Emilim ve Deriye Uygulanan Yarı Katı Preparatlar. In: *Modern Farmasötik Teknoloji* Ed.: TEB Eczacılık Akademisi Yayını Vol. No:1, 337-364.
- DIEPVENS K, WESTERTERP KR, WESTERTERP-PLANTENGA MS (2007). Obesity and thermogenesis related to the consumption of caffeine, ephedrine, capsaicin, and green tea. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **292(1)**: R77-85. doi:10.1152/ajpregu.00832.2005
- DJEKIC L, IBRIC S, PRIMORAC M (2011). Application of artificial neural networks (ANNS) in development of pharmaceutical microemulsions. *Focus on Artificial Neural Networks*: 1-28.
- DODD SL, HERB RA, POWERS SK (1993). Caffeine and exercise performance. An update. *Sports Med*, **15(1)**: 14-23. doi:10.2165/00007256-199315010-00003
- DRAKE B, PRATER CB, WEISENHORN AL, GOULD SAC, ALBRECHT TR, QUATE CF, CANNELL DS, HANSMA HG, HANSMA PK (1989). Imaging crystals, polymers, and processes in water with the atomic force microscope. *Science*, **243(4898)**: 1586-1589. doi:10.1126/science.2928794
- FADDA P, MONDUZZI M, CABOI F, PIRAS S, LAZZARI P (2013). Solid lipid nanoparticle preparation by a warm microemulsion based process: Influence of microemulsion microstructure. *Int J Pharm*, **446(1)**: 166-175. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.02.027>
- FISCHER TW, HIPLER UC, ELSNER P (2007). Effect of caffeine and testosterone on the proliferation of human hair follicles in vitro. *International Journal of Dermatology*, **46(1)**: 27-35. doi:10.1111/j.1365-4632.2007.03119.x
- FLORESCU C, IGEL C (2018). Resilient Backpropagation (Rprop) for Batch-learning in TensorFlow.
- GASCO MR. (1991).
- GOLDMAN MP (2002). Cellulite: A review of current treatments. *Journal of Cosmetic Dermatology*, **15**: 17-20.
- GUIDELINE IHT. (2005). *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)*. Paper presented at the International conference on harmonization, Geneva, Switzerland.
- GUIDELINE IHT (2008). Pharmaceutical quality system Q10. *Current Step*, **4**.

- GUIDELINE IHT. (2009). *Pharmaceutical Development Guideline Q8(R2)*. . Paper presented at the The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
- GUILLAUME D, CHARROUF Z (2011). Argan oil and other argan products: Use in dermocosmetology. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **113**: 403-408. doi:10.1002/ejlt.201000417
- HAMISHEHKAR H, SHOKRI J, FALLAHI S, JAHANGIRI A, GHANBARZADEH S, KOUHSOLTANI M. (2014). Histopathological evaluation of caffeine-loaded solid lipid nanoparticles in efficient treatment of cellulite. (Ed. Vol. 41).
- HAMISHEHKAR H, SHOKRI J, FALLAHI S, JAHANGIRI A, GHANBARZADEH S, KOUHSOLTANI M (2015). Histopathological evaluation of caffeine-loaded solid lipid nanoparticles in efficient treatment of cellulite. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **41(10)**: 1640-1646. doi:10.3109/03639045.2014.980426
- HERMAN A, HERMAN AP (2013). Caffeine's Mechanisms of Action and Its Cosmetic Use. *Skin Pharmacology and Physiology*, **26(1)**: 8-14. doi:10.1159/000343174
- HUYNH NT, PASSIRANI C, SAULNIER P, BENOIT JP (2009). Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine. *Int J Pharm*, **379(2)**: 201-209. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.04.026>
- KATZ M, POULSEN BJ. (1971). Absorption of Drugs through the Skin. In: *Concepts in Biochemical Pharmacology: Part 1* Ed.: Brodie, B. B., Gillette, J. R., Ackerman, H. S., Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 103-174.
- KECK CM, MÜLLER RH (2013). Nanotoxicological classification system (NCS) – A guide for the risk-benefit assessment of nanoparticulate drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **84(3)**: 445-448. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.01.001>
- KHAZAELI P, PARDAKHTY A, SHOORABI H (2007). Caffeine-loaded niosomes: characterization and in vitro release studies. *Drug Deliv*, **14(7)**: 447-452. doi:10.1080/10717540701603597
- KIRBY AR, PATRICK GUNNING A, MORRIS VJ (1995). Imaging xanthan gum by atomic force microscopy. *Carbohydrate Research*, **267(1)**: 161-166. doi:[https://doi.org/10.1016/0008-6215\(94\)00294-P](https://doi.org/10.1016/0008-6215(94)00294-P)
- KIŞLALIOĞLU MS. (2016). Dermakozmetik Kozmesötik Kavramına Genel Bakış. In: *Dermakozmetik Kozmesötik Madde ve Ürünler* Ed.: Y., Y., İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 3-11.
- KLIGMAN D (2000). Cosmeceuticals. *Dermatologic Clinics*, **18(4)**: 609-+. doi:Doi 10.1016/S0733-8635(05)70211-4
- KÜCHLER S, ABDEL-MOTTALEB M, LAMPRECHT A, RADOWSKI MR, HAAG R, SCHÄFER-KORTING M (2009). Influence of nanocarrier type and size on skin delivery of hydrophilic agents. *Int J Pharm*, **377(1-2)**: 169-172.
- KÜCHLER S, RADOWSKI MR, BLASCHKE T, DATHE M, PLENDL J, HAAG R, SCHÄFER-KORTING M, KRAMER KD (2009). Nanoparticles for skin penetration enhancement—a comparison of a dendritic core-multishell-nanotransporter and solid lipid nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **71(2)**: 243-250.



- LAOUINI A, JAAFAR-MAALEJ C, LIMAYEM BLOUZA I, SFAR S, CHARCOSSET C, FESSI H. (2012). Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. (Ed. Vol. 1).
- LI S, BERGER J, HARTLAND S (1990). UV spectrophotometric determination of theobromine and caffeine in cocoa beans. *Analytica Chimica Acta*, **232**: 409-412. doi:[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)81263-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)81263-5)
- LIPPACHER A, MULLER RH, MADER K (2001). Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm*, **214(1-2)**: 9-12.
- LIPPACHER A, MÜLLER RH, MÄDER K (2000). Investigation on the viscoelastic properties of lipid based colloidal drug carriers. *Int J Pharm*, **196(2)**: 227-230. doi:[https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00428-7](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00428-7)
- LIUZZI R, CARCIATI A, GUIDO S, CASERTA S (2016). Transport efficiency in transdermal drug delivery: What is the role of fluid microstructure? *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **139**: 294-305. doi:<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.11.064>
- LODEN M (2003). Role of topical emollients and moisturizers in the treatment of dry skin barrier disorders. *Am J Clin Dermatol*, **4(11)**: 771-788. doi:10.2165/00128071-200304110-00005
- LOHANI A, VERMA A, JOSHI H, YADAV N, KARKI N (2014). Nanotechnology-Based Cosmeceuticals. *ISRN Dermatology*, **2014**: 14. doi:10.1155/2014/843687
- LOMBARDI BORGIA S, REGEHLY M, SIVARAMAKRISHNAN R, MEHNERT W, KORTING HC, DANKER K, RÖDER B, KRAMER KD, SCHÄFER-KORTING M (2005). Lipid nanoparticles for skin penetration enhancement—correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and paretic spectroscopy. *Journal of Controlled Release*, **110(1)**: 151-163. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.09.045>
- LU YP, LOU YR, LIN Y, WEICHUNG JOE S, HUANG MT, YANG CS, CONNEY AH (2001). Inhibitory effects of orally administered green tea, black tea, and caffeine on skin carcinogenesis in mice previously treated with ultraviolet B light (high-risk mice): Relationship to decreased tissue fat. *Cancer Research*, **61(13)**: 5002-5009.
- LUCKS JS, MULLER RH. (1991).
- MEHNERT W, MADER K (2012). Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **64**: 83-101. doi:10.1016/j.addr.2012.09.021
- MENON GK (2002). New insights into skin structure: scratching the surface. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **54**: S3-S17. doi:[https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00121-7](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00121-7)
- MESUT B, OZSOY Y, AKSU B (2015). The place of drug product critical quality parameters in quality by design (QBD). *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, **12**: 75-92.
- MICHALOWSKI C, GUTERRES S, DALLA COSTA T (2004). Microdialysis for evaluating the entrapment and release of a lipophilic drug from nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **35(5)**: 1093-1100.
- MISHRA V, THAKUR S, PATIL A, SHUKLA A (2018). Quality by design (QbD) approaches in current pharmaceutical set-up. *Expert Opin Drug Deliv*, **15(8)**: 737-758. doi:10.1080/17425247.2018.1504768
- MONTAGNA W, PARAKKAL PF. (1974). 1 - An Introduction to Skin. In: *The Structure & Function of Skin (Third Edition)* Ed.: Montagna, W. Parakkal, P. F.: Academic Press. 1-17.

- MOSER K, KRIWET K, NAIK A, KALIA YN, GUY RH (2001). Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **52(2)**: 103-112. doi:[https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(01\)00166-7](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(01)00166-7)
- MÜLLER RH, GOHLA S, KECK CM (2011). State of the art of nanocrystals – Special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **78(1)**: 1-9. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.01.007>
- MULLER RH, PETERSEN RD, HOMMOSS A, PARDEIKE J (2007). Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Adv Drug Deliv Rev*, **59(6)**: 522-530. doi:10.1016/j.addr.2007.04.012
- MULLER RH, RADTKE M, WISSING SA (2002a). Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int J Pharm*, **242(1-2)**: 121-128. doi:Pii S0378-5173(02)00180-1
- Doi 10.1016/S0378-5173(02)00180-1
- MULLER RH, RADTKE M, WISSING SA (2002b). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **54**: S131-S155. doi:Pii S0169-409x(02)00118-7
- Doi 10.1016/S0169-409x(02)00118-7
- MÜLLER-GOYMANN CC (2004). Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **58(2)**: 343-356. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.03.028>
- MÜNCH S, WOHLRAB J, NEUBERT RHH (2017). Dermal and transdermal delivery of pharmaceutically relevant macromolecules. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **119**: 235-242. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.06.019>
- NEL A, XIA T, MADLER L, LI N (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, **311(5761)**: 622-627. doi:10.1126/science.1114397
- NUMANOĞLU U, TARIMCI N (2006). Katı lipid nanopartiküllerin (SLNTM) özellikleri, farmasötik ve kozmetik alandaki uygulamaları. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi.*, **35(3)**: 211-235.
- OECD. (2004). Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method. (Ed.).
- PANCHAL SK, POUDYAL H, WAANDERS J, BROWN L (2012). Coffee extract attenuates changes in cardiovascular and hepatic structure and function without decreasing obesity in high-carbohydrate, high-fat diet-fed male rats. *J Nutr*, **142(4)**: 690-697. doi:10.3945/jn.111.153577
- PARDEIKE J, HOMMOSS A, MÜLLER RH (2009). Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int J Pharm*, **366(1)**: 170-184. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.10.003>
- PHARMACOPEA B. (1988). British Pharmacopea (pp. Appendix ! E A 71).
- PIRES-DE-CAMPOS MSM, LEONARDI GR, CHORILLI M, SPADARI-BRATFISCH RC, POLACOW MLO, GRASSI-KASSISSE DM (2008). The effect of topical caffeine on the morphology of swine hypodermis as measured by ultrasound. *Journal of Cosmetic Dermatology*, **7(3)**: 232-237. doi:10.1111/j.1473-2165.2008.00397.x

- POLETTI FS, BECK RCR, GUTERRES SS, POHLMANN AR. (2011). Polymeric Nanocapsules: Concepts and Applications. In: *Nanocosmetics and Nanomedicines: New Approaches for Skin Care* Ed.: Beck, R., Guterres, S., Pohlmann, A., Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 49-68.
- PRAMOD K, TAHIR MA, CHAROO NA, ANSARI SH, ALI J (2016). Pharmaceutical product development: A quality by design approach. *Int J Pharm Investig*, **6(3)**: 129-138. doi:10.4103/2230-973x.187350
- PUGLIA C, OFFERTA A, TIRENDI GG, TARICO MS, CURRERI S, BONINA F, PERROTTA RE (2016). Design of solid lipid nanoparticles for caffeine topical administration. *Drug Deliv*, **23(1)**: 36-40. doi:10.3109/10717544.2014.903011
- RAHMAN Z, ZIDAN AS, KHAN MA (2010). Non-destructive methods of characterization of risperidone solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*, **76(1)**: 127-137. doi:10.1016/j.ejpb.2010.05.003
- RAI VK, MISHRA N, YADAV KS, YADAV NP (2018). Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. *Journal of Controlled Release*, **270**: 203-225. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.049>
- RAWLINGS AV (2006). Cellulite and its treatment. *Int J Cosmet Sci*, **28(3)**: 175-190. doi:10.1111/j.1467-2494.2006.00318.x
- RIEDMILLER M, BRAUN H. (1993). *A direct adaptive method for faster backpropagation learning: The RPROP algorithm*. Paper presented at the Proceedings of the IEEE international conference on neural networks.
- ROSSI ABR, VERGNANINI AL (2000). Cellulite: a review. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, **14**: 251-262.
- SADUF MAW, WANI A (2013). Comparative study of back propagation learning algorithms for neural networks. *International Journal of Advanced Research in Computer Science and Software Engineering*, **3(12)**.
- SALOME AMARACHI C, KENECHUKWU F, ATTAMA A. (2014). Nanoemulsions — Advances in Formulation, Characterization and Applications in Drug Delivery. (Ed.).
- SALVI VR, PAWAR P (2019). Nanostructured lipid carriers (NLC) system: A novel drug targeting carrier. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **51**: 255-267. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.02.017>
- SCHÄFER-KORTING M, MEHNERT W, KORTING H-C (2007). Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Adv Drug Deliv Rev*, **59(6)**: 427-443.
- SEN T (2016). Deri yaşlanması ve antioksidanların önemi. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, **40**: 36-53. doi:10.1501/Eczfak\_0000000578
- SHAH B, KHUNT D, BHATT H, MISRA M, PADH H (2015). Application of quality by design approach for intranasal delivery of rivastigmine loaded solid lipid nanoparticles: Effect on formulation and characterization parameters. *Eur J Pharm Sci*, **78**: 54-66. doi:10.1016/j.ejps.2015.07.002
- SILVA AC, SANTOS D, FERREIRA DC, SOUTO EB (2009). Minoxidil-loaded nanostructured lipid carriers (NLC): characterization and rheological behaviour of topical formulations. *Pharmazie*, **64(3)**: 177-182.

- SIMSOLO EE, EROĞLU I, TANRIVERDI ST, OZER O (2018). Formulation and Evaluation of Organogels Containing Hyaluronan Microparticles for Topical Delivery of Caffeine. *AAPS PharmSciTech*, **19(3)**: 1367-1376. doi:10.1208/s12249-018-0955-x
- SIMSOLO EE, EROĞLU İ, TANRIVERDI ST, ÖZER Ö (2018). Formulation and Evaluation of Organogels Containing Hyaluronan Microparticles for Topical Delivery of Caffeine. *AAPS PharmSciTech*, **19(3)**: 1367-1376. doi:10.1208/s12249-018-0955-x
- SINGH N, MANSHIAN B, JENKINS GJ, GRIFFITHS SM, WILLIAMS PM, MAFFEIS TG, WRIGHT CJ, DOAK SH (2009). NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, **30(23-24)**: 3891-3914. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.04.009
- SJÖSTRÖM B, BERGENSTÅHL B (1992). Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions I. Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate. *Int J Pharm*, **88(1)**: 53-62. doi:[https://doi.org/10.1016/0378-5173\(92\)90303-J](https://doi.org/10.1016/0378-5173(92)90303-J)
- SMITH WP. (1995). Cellulite treatments: Snake oils or skin science. (Ed. Vol. 110).
- SOUTO E, ALMEIDA A, MÜLLER R (2007). Lipid nanoparticles (SLN®, NLC®) for cutaneous drug delivery: structure, protection and skin effects. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, **3(4)**: 317-331.
- TADROS T, IZQUIERDO P, ESQUENA J, SOLANS C (2004). Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, **108-109**: 303-318. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.023>
- TAKAYAMA K, FUJIKAWA M, OBATA Y, MORISHITA M (2003). Neural network based optimization of drug formulations. *Adv Drug Deliv Rev*, **55(9)**: 1217-1231.
- TARIMCI N. (2004). Modern Kozmetik Taşıyıcı Sistemler. In: *Kozmetik Bilimi* Ed.: Yazan, Y., İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 253-274.
- TARIMCI N. (2008). *Deri yaşlanması ve alınacak önlemler*. Paper presented at the Afyon Eczacı Odası Etkinlikleri, Afyon.
- TEERANACHAIDEEKUL V, SOUTO EB, MÜLLER RH, JUNYAPRASERT VB (2008). Physicochemical characterization and in vitro release studies of ascorbyl palmitate-loaded semi-solid nanostructured lipid carriers (NLC gels). *Journal of microencapsulation*, **25(2)**: 111-120.
- TIRNAKSIZ F (2006). Selülit ve Kozmetik Uygulamalar. *Anadolu University Journal of Science and Technology*, **7**: 17-31.
- VELASCO MVR, TANO CTN, MACHADO-SANTELLI GM, CONSIGLIERI VO, KANEKO TM, BABY AR (2008). Effects of caffeine and siloxanetriol alginate caffeine, as anticellulite agents, on fatty tissue: histological evaluation. *Journal of Cosmetic Dermatology*, **7(1)**: 23-29. doi:10.1111/j.1473-2165.2008.00357.x
- VENUS M, WATERMAN J, MCNAB I (2011). Basic physiology of the skin. *Surgery (Oxford)*, **29(10)**: 471-474. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2011.06.010>
- VOGELGESANG B, BONNET I, GODARD N, SOHM B, PERRIER E (2011). In vitro and in vivo efficacy of sulfo-carrabiose, a sugar-based cosmetic ingredient with anti-cellulite properties. *Int J Cosmet Sci*, **33(2)**: 120-125. doi:10.1111/j.1468-2494.2010.00593.x

WESTESEN K, SIEKMANN B, KOCH MHJ (1993). Investigations on the physical state of lipid nanoparticles by synchrotron radiation X-ray diffraction. *Int J Pharm*, **93(1)**: 189-199. doi:[https://doi.org/10.1016/0378-5173\(93\)90177-H](https://doi.org/10.1016/0378-5173(93)90177-H)

WISSING S, LIPPACHER A, MULLER R (2001). Investigations on the occlusive properties of solid lipid nanoparticles (SLN). *J Cosmet Sci*, **52(5)**: 313-324.

Kozmetik Yönetmeliği, (2005).

YU LX (2008). Pharmaceutical Quality by Design: Product and Process Development, Understanding, and Control. *Pharmaceutical Research*, **25(4)**: 781-791. doi:10.1007/s11095-007-9511-1

YÜKSEL A, TARIMCI N (1988). Deriden Emilme: Biyolojik Mekanizmaya Bir Bakış. *Marmara Üniversitesi Eczacılık Dergisi*, **4(1)**: 35-44.

ZHAI H, MAIBACH HI (2001). Effects of skin occlusion on percutaneous absorption: an overview. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, **14(1)**: 1-10. doi:10.1159/000056328

ZHANG L, MAO S (2017). Application of quality by design in the current drug development. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **12(1)**: 1-8. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ajps.2016.07.006>

# ÖZGEÇMİŞ

## I. Bireysel Bilgiler

Adı	Çağla
Soyadı	ÖZTÜRK
Doğum Yeri ve Tarihi	Karabük 23.11.1985
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti
Medeni Durumu	Evli
İletişim Adresi ve Telefonu	Aziziye Mahallesi Refik Belendir Sokak Saygı Apt. 81/16 Çankaya/ANKARA 0507 940 04 51

## II. Eğitimi:

Lisans	2008, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Lise	2004, Zonguldak Fen Lisesi
Orta Okul	2001, Zonguldak Atatürk Anadolu Lisesi
İlk Okul	1997, Mehmetçik İlkokulu/Merzifon
Yabancı Dili	İngilizce

## III. Mesleki Deneyimi

Eczacı Subay
Mayıs 2010-Mayıs 2013 Samsun Asker Hastanesi
Mayıs2013-Aralık 2013 Kabil Asker Hastanesi/Afganistan
Ocak 2014-Ocak 2017 Kara Kuvvetleri Komutanlığı
Ocak 2017-... MSB Ordu İlaç Fabrikası Müdürlüğü

## **VI. Bilimsel Etkinlikler**

Amasya G., Öztürk Ç., Tarımcı N.,  
Influence the lipid material on  
physicochemical properties solid lipid  
nanoparticles, 12th International  
Symposium on Pharmaceutical Sciences,  
ISOPS-1 26-29 June 2018, Ankara,  
TURKEY.

